



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**HİSTON DEASETİLAZ İNHİBİTÖRÜ VORİNOSTATİN RATLARDA
OLUŞTURULAN SİSPLATİN NEFROTOKSİSİTESİ ÜZERİNE
KORUYUCU ETKİLERİ**

DOKTORA TEZİ

Dr. Yaşar YILDIRIM

DANIŞMAN

Prof. Dr. Meral ERDİNÇ

FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI

DİYARBAKIR 2021



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**HİSTON DEASETİLİZ İNHİBİTÖRÜ VORİNOSTATİN RATLARDA
OLUŞTURULAN SİSPLATİN NEFROTOKSİSİTESİ ÜZERİNE
KORUYUCU ETKİLERİ**

DOKTORA TEZİ

Dr. Yaşar YILDIRIM

DANIŞMAN

Prof. Dr. Meral ERDİNÇ

FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI

Bu tez Dicle Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından

TIP.18.037 nolu doktora proje numarası ile desteklenmiştir.

DİYARBAKIR 2021



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

ONAY

Dicle Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı Doktora öğrencisi **Yaşar YILDIRIM**'ın hazırladığı “**Histon Deasetilaz İnhibitörü Vorinostatın Ratlarda Oluşturulan Sisplatin Nefrotoksitesisi Üzerine Koruyucu Etkileri**” başlıklı Tez Dicle Üniversitesi Lisansüstü Eğitim - Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca kapsam ve bilimsel kalite yönünden değerlendirilerek **Doktora Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Tarih: 25/06/2021

Danışman: Prof. Dr. Meral ERDİNÇ

Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi

Jüri Üyeleri

Jüri Başkanı: Prof. Dr. Meral ERDİNÇ

Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi

Üye Prof. Dr. Nuriye METE

Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi

Üye Prof. Dr. Ensari GÜNELİ

Dokuz Eylül Üniversitesi

Üye Doç. Dr. İlker KELLE

Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi

Üye Dr. Öğr. Üyesi Emre UYAR

İnönü Üniversitesi Ecz. Fakültesi

Bu tez Dicle Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun/.../2021 tarih ve sayılı kararıyla onaylanmıştır.

...../...../.....

Prof. Dr. Hakkı Murat BİLGİN
Dicle Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını ve tezimi Dicle Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kılavuzu standartlarına uygun bir şekilde hazırladığımı beyan ederim.

25/06/2021

Öğrencinin Adı ve Soyadı

Yaşar YILDIRIM

İmza:

TEŞEKKÜR

Doktora öğreniminin başladığı ilk günden bugüne kadar bilimsel tecrübesini, desteğini ve güleryüzünü esirgemeyen çok değerli hocam Prof. Dr. Meral ERDİNÇ'e, çalışmama sundukları katkı ve yardımlarından dolayı Doç. Dr. İlker KELLE'ye, Dr. Öğretim Üyesi Zeynep Erdoğan ÖZGEN'e, Dr. Öğretim Üyesi Ayşenur KELEŞ'e, Dr. Öğretim Üyesi Emre UYAR'a, Arş. Gör. Meryem Şeyda KAYA'ya, Dr. Öğretim Üyesi Abdullah KARAKUŞ'a, Uzm. Dr. Mustafa CENGİZ'e, Uzm. Dr. Serhat ERGÜL'e, Dr. Mehmet EFE'ye ve bu günlere gelmemde büyük fedakarlıklar gösteren aileme sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez Dicle Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu Başkanlığı tarafından TIP.18.037 numaralı proje ile desteklenmiştir.

Dr. Yaşar YILDIRIM

Diyarbakır

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

1.Ön Sayfalar	Sayfa
Kapak	
İç Kapak	
Onay Sayfası	I
Beyan Sayfası.....	II
Teşekkür Sayfası	III
İçindekiler Dizini	IV
Şekiller Dizini	VII
Tablolar Dizini	VIII
Resimler Dizini.....	IX
Simgeler ve Kısaltmalar Dizini	X
1. ÖZET	1
1.1.Türkçe Özet	1
1.2. Abstract.....	3
2. GİRİŞ ve AMAÇ	5
3. GENEL BİLGİLER	7
3.1. Nefrotoksisite	7
3.1.1. Nefrotoksisiteye yatkınlık oluşturan durumlar.....	7
3.1.2. Nefrotoksisitede okidatif hasar teorisi	8
3.1.3. Böbreklerin toksik hasara duyarlı olması.....	8
3.1.4. Böbreği toksik hasara yatkın hale getiren durumlar	8
3.1.5. Nefrotoksisite gelişimine neden olan mekanizmalar	9
3.1.6. Nefrotoksinler ve etkileri	9
3.2. Sisplatin.....	10
3.2.1. Sisplatin.....	10
3.2.2. Sisplatinin kullanımı ve etkileri.....	10
3.2.3. Sisplatin nefrotoksisitesi.....	11
3.2.4. Sisplatinin hücre içine transportu ve metabolizması.....	11
3.2.4.1. Sisplatinin böbrek hücrelerinde birikimi.....	11
3.2.4.2. Proksimal tübüle alım ve birikim.....	13
3.2.5. Sisplatin sitotoksisitesi.....	14

3.2.5.1. Sisplatinin hücresel hedefleri.....	14
3.2.5.2. Sisplatin nedenli böbrek hasarının patofizyolojisi.....	15
3.2.5.3. Sisplatin nedenli hücre siklus değişimleri ve hücre ölümü ile ilgili moleküler mekanizmalar.....	15
3.2.6. Sisplatin toksisitesinde apoptotik yollar.....	16
3.2.6.1 Sisplatin ve kaspazlar (ekstrinsik yolak).....	16
3.2.6.2 Sisplatin ve intrinsik mitokondriyal yolak.....	17
3.2.6.3 Sisplatin ve endoplazmik retikulum stres yolağı.....	17
3.2.6.4 Böbrek hücre hasarı ve hücre siklus düzenleyicileri.....	17
3.2.6.5 Sisplatin nefrotoksitesitesi ve p53.....	17
3.2.7. Sisplatin nefrotoksitesitesinde inflamasyon.....	18
3.2.7.1 Sisplatin hasarlı böbreklerde sitokin ağı	19
3.2.7.1.1 Sisplatin nefrotoksitesitesinde TNF-alfa.....	19
3.2.8 Sisplatin ve otofaji.....	20
3.2.9 Sisplatin nefrotoksitesitesinin klinik yansımaları.....	20
3.2.9.1 Sisplatin tedavisinde böbrek koruyucu yaklaşımlar.....	21
3.3 Histonlar.....	21
3.3.1. Histonların yapısı.....	21
3.3.2 Histonların posttranslasyonel modifikasyonları.....	22
3.3.2.1 Histonların asetilasyonu.....	22
3.3.2.2 Histon asetiltransferaz (HAT) ve histon deasetilaz (HDAC) enzimleri.....	23
3.3.3 Histon deasetilaz inhibitörleri (HDACi).....	23
3.3.3.1 HDACi'nin etki mekanizması.....	24
3.3.3.2 HDACi tipleri.....	25
3.3.3.3 Vorinostat (suberoilanolid hidroksamik asit).....	26
3.3.3.4 Vorinostat ve otofaji.....	27
3.3.3.5 Vorinostatın antiinflamatuvar etkileri.....	27
3.3.3.6 Vorinostatın farmakokinetiği.....	28
3.3.3.7 Vorinostatın farmakodinamiği.....	28
4.GEREÇ ve YÖNTEM	30
4.1.Gereç	30
4.1.1.Kullanılan araç ve gereçler	30

4.1.2.Kullanılan deney hayvanları	30
4.1.3.Kullanılan kimyasal maddeler	31
4.2.Yöntem	31
4.2.1.Farmakolojik inceleme	32
4.2.2.Biyokimyasal inceleme	33
4.2.3.Histopatolojik inceleme	34
4.2.4.Western-Blot incelemesi.....	34
4.2.4.1.Kullanılan gereçler.....	34
4.2.4.2.Kullanılan tampon ve çözeltilerin hazırlanışı.....	36
4.2.4.3 Doku örnekleme.....	37
4.2.4.4. SDS-PAGE (Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel) elektroforez.....	39
4.2.5.İstatistiksel değerlendirme	42
5.BULGULAR	44
5.1.Farmakolojik bulgular	44
5.2.Biyokimyasal bulgular	44
5.3.Histopatolojik bulgular.....	45
5.4.Western-Blot analizleri.....	52
6.TARTIŞMA	54
7.SONUÇ ve ÖNERİLER.....	58
8.KAYNAKLAR	59
9.ÖZGEÇMİŞ	72
10.EKLER.....	73
10.1.Etik kurul kararı.....	73
10.2.Orijinallik raporu.....	74
10.3.Tez intihal formu.....	75

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil.1. Böbreğe toksik etkili maddelerin etkili olduğu alanlar	9
Şekil.2. Sisplatinin moleküler yapısı.....	10
Şekil.3. Sisplatin kaynaklı epitelyal hücre ölümünün yolları.....	13
Şekil.4. Sisplatin nefrotoksitesinin immün mekanizması	18
Şekil.5. Histon proteinleri amino ucu kuyrukları ve kor nükleozom yapısı	21
Şekil.6. Vorinostatın moleküler yapısı	26
Şekil.7. Gruplara göre böbrek perfüzyon basınç değişimleri (mm/Hg)	44
Şekil.8. Gruplara göre MDA düzeyleri (nmol/gr).....	45
Şekil 9. Actb, TNF-alfa , p21 ve PUMA-alfa proteinlerine ait western-blot bant görüntüsü.....	52
Şekil 10. Gruplara göre doku protein ekspresyon düzeyleri (%)......	53

TABLÖLAR DİZİNİ

Sayfa

Tablo.1. Krebs Henseleit solüsyonu	31
Tablo.2. BSA standartlarının hazırlanması için kullanılan şema	38
Tablo.3. Ayırıcı jelin içeriği.....	39
Tablo.4. Yoğunlaştırıcı jelin içeriği.....	40



RESİMLER DİZİNİ

Sayfa

Resim.1. Langendorff düzeneğine asılmış rat böbreği.....	33
Resim.2. Elektroforez düzeneğine numunelerin yüklenmesi.....	40
Resim.3. Proteinlerin 40 mA’de sabit akımla ayrıştırılması.....	41
Resim.4. Kontrol grubu. Korunmuş tübüler organizasyon (H&E, 20x10).....	46
Resim.5. Kontrol grubu. Korunmuş fırçamsı kenar (PAS, 100x10).....	47
Resim.6. Sisplatin grubu. Tübül epitellerinde nükleus kaybı ile karakterli prenekrotik değişiklikler (H&E, 100x10).....	48
Resim.7. Sisplatin grubu. Tübül epitellerinde fırçamsı kenar kaybı (PAS, 100x10).....	48
Resim.8. Vorinostat+Sisplatin grubu. Hafif tübüler dilatasyon, tübül epitellerinde hafif hidropik dejenerasyon, hafif eozinofilik dejenerasyon (H&E, 40x10).....	49
Resim.9. Vorinostat+Sisplatin grubu. Fokal tübüler cast formasyonu (H&E, 40x10).....	50
Resim.10. Vorinostat grubu. Korunmuş tübüler organizasyon (H&E, 20x10).....	51
Resim.11. Vorinostat grubu. Korunmuş tübül epitel hücreleri (H&E, 100x10).....	51

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AIF:	Apoptozu Uyarıcı Faktör
CDK:	Siklin bağımlı kinaz
DNA:	Deoksi ribonükleik asit
FDA:	Birleşik Devletler gıda ve ilaç dairesi
HALT:	Fosfataz inhibitör kokteyli
HAT:	Histon Asetil Transferaz enzimi
HDAC:	Histon Deasetilaz enzimi
HDACi:	Histon Deasetilaz İnhibitörleri
IFN:	İnterferon
IL:	İnterlökin
i.p.:	İntraperitoneal
i.v.:	İntravenöz
mA:	miliamper
MDA:	Malon dialdehit
mEq:	Miliekivalan
NaCl:	Sodyum klorür molekülü
NH ₃ :	Amonyum iyonu
NSAİİ:	Steroid olmayan antiinflamatuvar ilaçlar
PUMA:	p53'ün artırdığı apoptoz düzenleyici
RNA:	Ribonükleik asit
TGF:	Transforme edici büyüme faktörü
Treg:	Regülatuar T hücre
TNF:	Tümör nekroz faktörü
T-PER:	Doku protein ayrıştırma reaktifi

1.ÖZET

HİSTON DEASETİLAZ İNHİBİTÖRÜ VORİNOSTATIN RATLARDA OLUŞTURULAN SİSPLATİN NEFROTOKSİTESİ ÜZERİNE KORUYUCU ETKİLERİ

Öğrencinin Adı ve Soyadı: Dr. Yaşar YILDIRIM

Danışmanı: Prof. Dr. Meral ERDİNÇ

Anabilim Dalı: Tıbbi Farmakoloji AD.

1.1.Türkçe Özet

Amaç: Bu çalışmada ratlarda sisplatin ile oluşturulan nefrotoksisite üzerine histon deasetilaz inhibitörü vorinostatın etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Araştırmada, 32 adet Sprague-Dawley cinsi erkek rat 4 gruba ayrıldı. 1.grup Kontrol grubu, 2.grup Sisplatin grubu, 3.grup Vorinostat+Sisplatin grubu ve 4.grup Vorinostat grubu. 1.gruba tek doz i.p. salin verildi. 2.gruba 5 mg/kg tek doz sisplatin i.p. verildi. 3.gruba önce 24 saat arayla 50mg/kg iki doz vorinostat i.p. verildi ve son vorinostat dozundan 6 saat sonra tek doz 5 mg/kg sisplatin i.p. verildi. 4. Gruba ise 24 saat arayla 50mg/kg iki doz vorinostat i.p. verildi. Tüm gruplarda son ilaç uygulanmasından 5 gün sonra anestezi altında laparotomi yapılarak böbrekler izole edildi. Sol böbrekler perfüzyon basıncı ölçümleri için langendorff düzeneği ile perfüze edildi. Sağ böbrekler histopatolojik inceleme, Western-Blot analizleri (TNF-alfa, p21, PUMA-alfa) ve MDA ölçümleri için kullanıldı. Ratlardan kardiyak kan alınarak serum üre ve kreatinin düzeyleri ölçüldü.

Bulgular: Sisplatin grubunda üre ve kreatinin, TNF-alfa, p21 ve PUMA-alfa düzeyleri Kontrol grubuna kıyasla anlamlı olarak yüksek bulundu ve bu nefrotoksisite lehine değerlendirildi. Ayrıca Sisplatin grubunda artan perfüzyon basınçları ve tübüler atrofi, epitel deskuamasyonu, debris, tübüler lümende nekrotik materyal ve interstisyel dokuda lenfosit yoğunluğu gibi histopatolojik değişimler

nefrotoksisiteyi destekledi. Vorinostat+Sisplatin grubundaki aynı parametrelerin Sisplatin grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde azaldığı görüldü.

Sonuç: Sonuç olarak, vorinostatın sisplatine bağlı gelişen nefrotoksisite üzerine koruyucu etkileri olduğu görüldü.

Anahtar kelimeler: Vorinostat, sisplatin, nefrotoksisite, p21, PUMA-alfa, TNF-alfa



PROTECTIVE EFFECTS OF HISTONE DEACETYLASE INHIBITOR VORINOSTAT ON CISPLATIN NEFROTOXICITY IN RATS

Student's Surname and Name: Dr. YILDIRIM Yaşar

Adviser of Thesis: Prof. Dr. ERDİNÇ Meral

Department: Medical Pharmacology

1.2. Abstract

Aim: In this study, we aimed to investigate the effect of vorinostat -histone deacetylase inhibitor-on cisplatin-induced nephrotoxicity in rats.

Material and Method: 32 male Sprague-Dawley rats were divided into 4 groups. 1.Control group, 2.Cisplatin group, 3.Vorinostat+Cisplatin group and 4.Vorinostat group. A single dose of i.p. saline was given to the first group. In the second group, a single dose of cisplatin (5 mg/kg i.p.) was given. In the third group, two doses of 50mg/kg vorinostat was injected i.p. with a 24 hours interval and 6 hours after the last dose of vorinostat, a single dose of 5 mg/kg i.p. cisplatin was given. In the forth group, two doses of 50mg/kg vorinostat was injected i.p. with a 24 hours interval. In all groups, 5 days after the last doses rats were anesthetized and with a laparotomy left kidneys were isolated and perfused via renal artery by Langendorff system and used for perfusion pressure measurement. Right kidneys were isolated for histopathological evaluation, Western-Blot analysis (TNF-alpha, p21, PUMA-alpha) and MDA measurements. Blood was drawn by cardiac puncture to measure serum urea and creatinine consantration.

Results: Perfusion pressures, serum urea and creatinine levels, TNF-alpha, p21 and PUMA-alpha and MDA levels were found to be significantly higher in the Cisplatin group compared to the Control group and this was evaluated for nephrotoxicity. In addition, histopathological changes such as tubular atrophy, epithelial desquamation, debris, necrotic material in the tubular lumen and lymphocyte density in the

interstitial tissue supported nephrotoxicity. All these parameters significantly decreased in the Vorinostat+Cisplatin group compared to the Cisplatin group.

Conclusions: As a result it was observed that vorinostat has protective effects on cisplatin-induced nephrotoxicity.

Key Words: Vorinostat, cisplatin, nephrotoxicity, p21, PUMA-alfa, TNF-alfa



2. GİRİŞ VE AMAÇ

Sisplatin, uzun yıllardan beri çeşitli solid tümörlerin tedavisinde kullanılan kemoterapötik bir ajandır. Sisplatinin kemoterapötik olarak kullanılmaya başlanmasıyla birlikte çeşitli yan etkileri de ortaya çıkmıştır. Sisplatinin yan etkilerinden en önemlisi nefrotoksitedir (1,2). Bu yan etkinin ortaya çıkması, sisplatinin kanser tedavisinde etkin şekilde kullanılmasının önündeki en önemli engel olmuştur. Sisplatin nefrotoksitesinin etiyolojisinde birden fazla faktör rol almaktadır. Bunların başlıcaları; renal kan akımında azalma, artmış renal vasküler rezistans, ilacın tübül hücre DNA'sı ile etkileşimi ve bunun sonucunda proksimal tübül disfonksiyonu gelişimi, tübül hücrelerindeki Na-K ATPaz aktivitesinin inhibisyonu, mitokondriyal bozukluklar, oksidatif stres, peroksidasyona karşı koruyucu enzim aktivitelerinde azalmalar ve renin-anjiotensin-aldosteron sistemindeki değişikliklerdir (3). Yapılan çalışmalar, sisplatinin neden olduğu nefrotoksitenin zemininde inflamasyon, apoptoz ve nekroptoz gibi patolojik mekanizmaların yer aldığını göstermiştir (3,4). Son yıllarda histonların asetilasyonu ve deasetilasyonunun; tümör gelişimi, enflamasyon, hücre yaşlanması ve benzeri birçok hücreyel olayda etkin olduğuna dair epigenetik temelli çalışmalar yapılmıştır (5-6).

Histonları asetilleyen enzim histon asetiltransferaz (HAT), deasetilleyen enzim ise histon deasetilaz (HDAC)'dır. HDAC, histondan asetil gruplarını ayırarak transkripsiyon baskılayıcısı gibi etki gösterirler (7) ve histon deasetilaz inhibitörleri (HDACi) bu baskılamayı selektif olarak değiştirebilirler (8). Bu ajanlar halen kanser tedavisinde potansiyel ilaç olarak kullanılırken, yapılan hücre çalışmalarında hücre siklusu durması, hücre farklılaşması, anti-anjiogenez ve otofaji gibi etkilerin elde edilmesiyle başka hastalıkların tedavisinde umut vadettiği düşünülmektedir birçok in vitro ve in vivo çalışmalar yapılmıştır (9-14)

HDACi ailesi; kısa zincirli yağ asitleri, trisiklik tetrapeptitler, benamidler ve hidroksamik asit türevlerinden oluşmaktadır (15). Çalışmamızda kullandığımız

vorinostat, bir hidroksamik asit türevi olup 1. (HDAC1, HDAC2 ve HDAC3) ve 2. sınıf (HDAC6) HDAC enzimleri üzerindeki inhibe edici etkisi sayesinde; doku düzeyinde immun yanıt modülasyonu, anjiyogenez inhibisyonu, hücre motilitesi, apoptoz ve hücre siklusunun devamı gibi biyolojik süreçler üzerinde çeşitli etkilere sahiptir (16). Bu etkiler ışığında; vorinostatın nöroprotektif (17), kardiyoprotektif (18), antiinflamatuvar (19) ve nefroprotektif (20) etkinliklerini gösteren birçok bilimsel çalışma yapılmıştır.

Sisplatinin neden olduğu nefrotoksisitenin (özellikle akut böbrek hasarı) tedavisi için bugüne kadar birçok yöntem denenmiş ancak tam bir terapötik etkinlik elde edilememiştir. Salin ile hidrasyon, magnezyum takviyesi, mannitol ve amifostin tedavisi sisplatin nefrotoksisitesini belirgin oranda düşürmede yaygın kabul görmüş uygulamalar olmuşlardır (21,22). Ancak bazı yaklaşımlar ya tam bir iyileşme sağlayamamış ya da antitümöral etkinliği azalttıkları için tedavide tercih edilmemişlerdir (22,23). Günümüzde sisplatine bağlı akut böbrek hasarını düzeltmek için bol hidrasyon ve magnezyum takviyesi geçerliliğini koruyan etkin bir klinik yaklaşım olmakla beraber, bu da tam bir düzelme sağlamadığı için bazı hastalarda sisplatin tedavisinden vazgeçilmesine sebebiyet vermektedir (24).

Rat proksimal tübül hücre kültüründe yapılan bir çalışmada; sisplatin verilerek hücrelerin %40-50'sinde apoptoz meydana geldiği, daha sonra verilen vorinostatın apoptozu %20-30'a düşürerek koruyucu etki gösterdiği bildirilmiş (20), vorinostatın tübül hücrelerindeki sisplatin nedenli apoptozu azaltırken, HCT116 kolon kanser hücrelerinde sisplatin tedavisinde in vitro olarak apoptozu artırdığı, in vivo olarak HDACi'nin sisplatin ile birlikte kullanılırken bir yandan protektif bir yandan da antikanser etki edebileceğini göstermiştir.

Bu çalışmada amacımız deneysel olarak sisplatin ile ratlarda oluşturulan nefrotoksisite modelinde, sisplatinin izole perfüze böbrekte renal vasküler rezistansı gösteren renal perfüzyon basıncı üzerine etkilerini ve beraberinde böbrek dokusunda histopatolojik ve hücresel gen düzeyinde meydana gelen değişiklikleri incelemek ve histon deasetilaz inhibitörü olan vorinostatın koruyucu etkilerini araştırmaktır.

3. GENEL BİLGİLER

3.1. Nefrotoksisite

Tipik bir böbrek; kandaki atıkları filtreleyen, kan pH'ını düzenleyen, vücudun sıvı dengesini sağlayan ve kırmızı kan hücresi yapımı, kemik sağlığı ve kan basıncı regülasyonu gibi hormonal fonksiyonları yerine getirmek için işbirliği içinde çalışan en az bir milyon adet nefrona sahiptir. Nefron; glomerül, proksimal tübül, henle kulpu, distal tübül ve toplayıcı tübüllerden oluşurken nefrotoksinlere maruz kalan esas bölüm proksimal tübüldür (1).

İnsanlar; yaşamları boyunca bilerek ya da bilmeyerek böbreklere zarar verme potansiyeline sahip birçok kimyasala maruz kalırlar. Doğal maddelerden endüstriyel kimyasallara, bunlardan çevresel atıklara kadar kimyasal yapısı farklı birçok ajan nefrotoksisiteye neden olmaktadır. Örneğin $HgCl_2$ (ağır metal), fumosin B (mantar zehiri), siklosporin A (immunsupresif ajan) ve aminoglikozid (antibiyotik) yapısal olarak benzer olmamalarına rağmen hepsi de akut böbrek yetmezliğine neden olurlar. Bununla birlikte böbrek hücre hasarındaki hücresel hedeflerin ve hücresel hasar mekanizmalarının etken kimyasala göre farklılık göstermesi şaşırtıcı olmayacaktır (4).

3.1.1. Nefrotoksisiteye yatkınlık oluşturan durumlar

Tübül hücreleri, dolaşan kimyasallara orantısız maruziyetleri ve yüksek hücre içi konsantrasyona neden olan transport sürecinden dolayı özellikle toksik hasara çok açıktır. Bir kimyasalın ya da metabolitinin iki yolla toksisiteye neden olduğu düşünülüyor. Birincisi; hücresel makromoleküllere kovalent ya da non-kovalent bağlanmak, ikincisi ise serbest oksijen radikali üretmek. Her iki durumda da makromoleküller, hücresel hasar yönünde çalışmaya başlar. Örneğin; hücre membranı lipid ve proteinleri, nükleus, lizozom, mitokondri ve sitoplazma bütün toksinlerin hedefi olur. Eğer toksin oksidatif strese yol açarsa hem lipid

peroksidasyonu hem de protein peroksidasyonu hücre hasarına katkıda bulunur. Birçok vakada mitokondri, toksinler için önemli bir hedeftir ve ortaya çıkan ATP azlığı böbreğin aerobik metabolizmasının enerji gereksiniminden dolayı hücre hasarına neden olur. ATP kaybı, hücrel iyon homeostazını bozarak membran depolarizasyonunu olumsuz yönde etkiler. Sitolik serbest Ca^{+2} artışı, hücre hasarının erken ya da ileri safhasında ortaya çıkar ve hücre ölümünde kritik öneme sahiptir (Ca^{+2} artışı, Ca^{+2} bağımlı nötral proteazları (kalpainler) aktive ederek hücre hasarına neden olur). Hücre hasarının geç fazı boyunca, artmış Cl^- influksunu takip eden, hücre lizisine neden olan büyük moleküllerin hücre içine girişi görülür (4).

3.1.2. Nefrotoksisitede oksidatif hasar teorisi

Oksidatif hasarda özellikle iki enzim rol oynar; 1- Fosfolipaz A2; oksidatif hasar boyunca hücre içinde yükselir ve hücre hasarına neden olan enzim ailesine aittir. 2- Kaspazlar; yine oksidatif hasarı takiben aktive olarak hücre hasarına neden olan sistein proteaz ailesine aittir. Bu maruziyet sürecinde hücreler apoptoz ya da onkoz mekanizmaları ile hasara uğrarlar ya da ölürlür (4).

3.1.3. Böbreklerin toksik hasara duyarlı olması

Böbreklerin kardiyak outputun %25'ini karşılaması, vazoaktif bileşenlere duyarlı olması, toksinleri, emilim ve sekresyon aşamalarında konsantre etmeleri, birçok transport proteininin intraselüler toksin konsantrasyonunu indirekt olarak artırması, geniş lümen yüzey alanı ve geniş biyotransformasyon kapasitesi toksik hasara duyarlılıklarını artırır (4).

3.1.4. Böbreği toksik hasara yatkın hale getiren durumlar

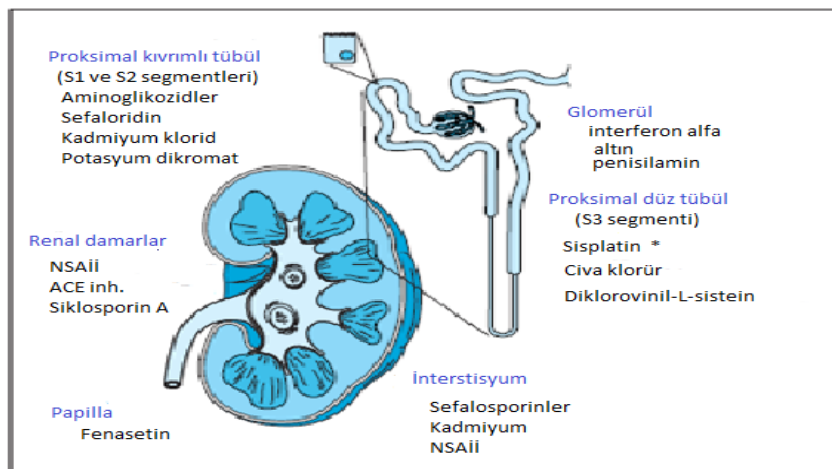
Mevcut renal disfonksiyon, dehidratasyon, diyabet, birçok nefrotoksin birden maruz kalma böbreği toksik hasara yatkın hale getirir (4).

3.1.5. Nefrotoksisite gelişimine neden olan mekanizmalar

Nefrotoksisite, kemoterapi sürecinin en büyük yan etkilerinden birisidir. Nefrotoksisite gelişimine neden olan mekanizmalar; oksidatif stres, DNA etkileşimi, inflamasyon, mitokondriyal disfonksiyon, tübül epitel hücrelerine direkt toksik etkidir (3)

3.1.6. Nefrotoksinler ve etkileri

Nefrotoksinler, böbreğin farklı bölgelerine etki ederek farklı sonuçlara neden olabilirler. NSAİİ'lar, ACE inhibitörleri, siklosporin A ve radyokontrast maddeler vazokonstriksiyona neden olurken; altın, IFN-alfa ve penisilamin glomerüler fonksiyon kaybı (proteinüri) yapar. Birçok nefrotoksin tübüler epitel hücreleri direkt olarak hasara uğratar. Aminoglikozidler, sefaloridin, kadmiyum klorid ve potasyum dikromat proksimal tübülün S1 ve S2 segmentlerini etkilerken; sisplatin, civa klorür ve diklorovinil-L-sistein S3 segmenti etkiler. Sefalosporinler, kadmiyum klorid ve NSAİİ'lar interstisyel nefrite neden olurken; fenasetin renal papiller nekroza neden olur (4).

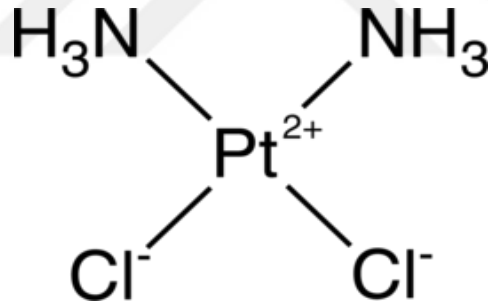


Şekil 1. Böbreğe toksik etkili maddelerin etkili olduğu alanlar (4)

3.2. Sisplatin

3.2.1. Sisplatin

Bakterileri bir elektrik sahasında öldürmeyi amaçlayan Barnett Rosenberg tarafından tesadüfen keşfedilmiştir. Rosenberg, bakterilerin elektrik saha yüzünden değil sahada bulunan platin elektrodlarından yayılan bir bileşik (cis-diamminedichloroplatinum²) nedeniyle öldüğünü fark etmiştir (25). Sisplatin, Cl⁻ konsantrasyonunun görece yüksek olduğu kanda değişmeden kalır. Ancak ne zaman ki Cl⁻ konsantrasyonunun düşük olduğu hücre içine girer o zaman iki Cl⁻ atomu bir su molekülü ile sisplatine eklenir ve sisplatin hidrolize olur (sulu metabolit). Bu sulu form, guaninin N7 pozisyonuna bağlanır ve DNA sarmalında çapraz bağlar oluşturarak sitotoksik mekanizmayı başlatır. Bunun dışında bir de serbest oksijen radikalleri açığa çıkaran mitokondri hasarına neden olur. Sisplatinin renal transport sisteminde fazlaca bulunması ve oksidatif stresin gelişmesi, böbreğe neden daha çok zarar verdiğini açıklar (25).



Şekil 2. Sisplatinin moleküler yapısı

3.2.2. Sisplatinin kullanımı ve etkileri

Sisplatin; baş-boyun, akciğer, özofagus, mesane, testis, over, serviks, meme, beyin (26), rahim (27), mide (28) gibi malign hastalıkların tedavisinde sık kullanılan bir kemoterapi ilacıdır. Kimyasal adı cis-diamminedichloroplatinum² olup cis konfigürasyonunda iki adet klorid ligandı taşır (26) (Şekil 2). Sisplatin, DNA'daki pürin bazlarla çapraz bağlar kurar ve DNA sentezini bozar (29). Bozulmuş hücre

bölünmesi, sisplatinin en önemli etkisidir ve buna bağlı olarak en yüksek aktivitesini hızlı çoğalan hücrelerde gösterir (29). Mide-barsak kanalından absorbe edilmez, sadece intravenöz (i.v.) uygulanır. Dokulara, plazma proteinlerine %90 oranında ve kısmen geri dönüşsüz olarak bağlanır. Verilişinden sonra dört ay süre ile böbrek dokusunda platin saptanabilir. Eliminasyon yarılanma ömrü 60 saat kadardır (30). Sisplatine bağlı en sık gözlenen doz bağımlı ve kümülatif yan etki, hastaların %30-40'ında ortaya çıkan nefrotoksisitedir (31).

3.2.3. Sisplatin nefrotoksisitesi

Klinikte, akut böbrek hasarı, tuz ya da magnezyum kaybı ve böbreğin idrarı konsantre etme yeteneğinin azalması olarak kendini gösterir (31). Sisplatine bağlı renal yetmezlik, bu maddenin böbrekte birikerek biyotransformasyona uğraması sonucu ortaya çıkar (31). Sisplatin nefrotoksisitesinin iyileştirilmesi ya da önlenmesi; hidrasyon, magnezyum takviyesi (8-16 mEq) ya da yüksek doz sisplatin alan ve/veya hipertansiyonu olan hastalarda mannitol ile zorlu diürez gibi destek tedavileri ile sağlanmaya çalışılır (21). Ancak mannitol tedavisi fazla diürece ve buna bağlı olarak dehidratasyona neden olduğu için, yüksek doz sisplatin alan hastalarda güvenli ve etkili bir renoprotektif ilaca ihtiyaç duyulmuştur (32). 2019 yılına kadar; amifostin (ethanethiol,2-[(3-aminopropyl)amino]dihydrogen phosphate ester)], sisplatinin yan etkilerine karşı nefroprotektif olduğu bilinen en yaygın kullanılan ilaçtır ancak ototoksisite, hipotansiyon, vertigo, hipokalsemi, ciddi bulantı ve kusma gibi birçok yan etki bu ilacın klinik kullanımını sınırlandırmıştır (22). Diğer tiyol kaynağı sitoprotektif ajanlar (diethyl-dithiocarbamate, reducedglutathionum ve sodium thiosulphate) sisplatine bağlı nefrotoksisiteyi azaltıyor gibi görünseler de hepsi de klinik kullanımlarını sınırlayan istenmeyen tümör koruyucu etki gösterir (23).

3.2.4. Sisplatinin hücre içine transportu ve metabolizması

3.2.4.1. Sisplatinin böbrek hücrelerinde birikimi

Glomerüler filtrasyon ve tübüler sekresyon esnasında sisplatin böbreklerde birikir (33). Renal proksimal tübül epitel hücreleri idrardaki ekskrete edilen

ksenobiyotiklere en çok maruz kalan hücrelerdir (34). Proksimal tübül epitel hücrelerindeki sisplatin konsantrasyonunun kandakinin beş katı olması, bu durumun bir sonucudur (33). Bu yüzden sisplatin kanda toksik olmayan düzeyde bile olsa böbrekte toksik düzeye ulaşabilir ve proksimal tübül S3 segmentinde meydana gelen ciddi hasara bağlı renal disfonksiyona neden olabilir (35). Sisplatinin hücresel birikimine aracılık eden önemli bir mekanizma bu ilacın taşıyıcı aracılı alımıdır (uptake).

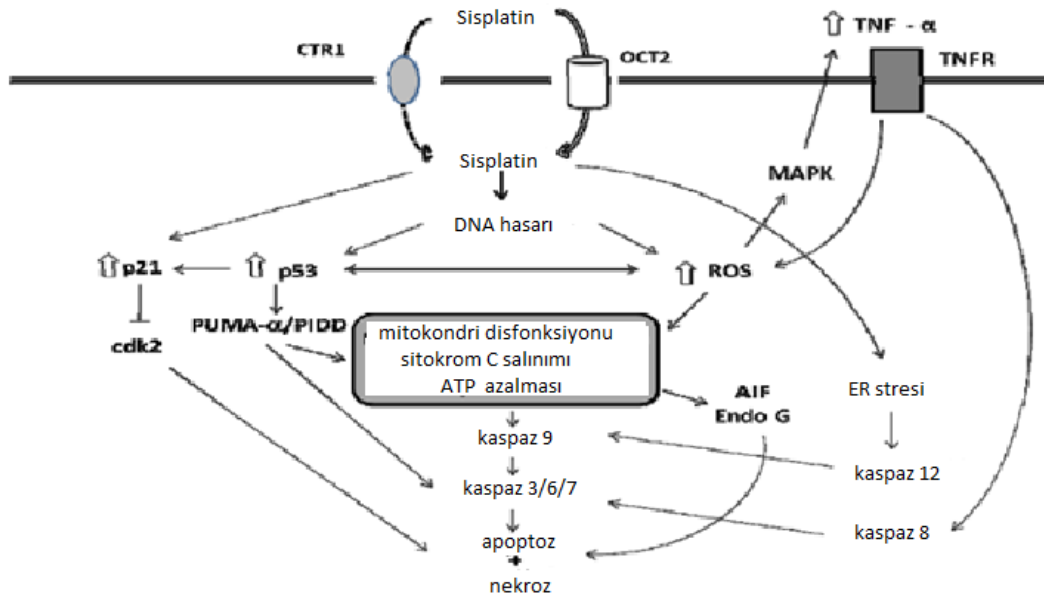
Sisplatini hücre membranından hücre içine/dışına götüren taşıyıcılar;

1-Organik katyon taşıyıcı 2 (OCT2)

2-Bakır taşıyıcı 1 (Ctr1)

3-Multidrug extrusion transporter 1 (MATE1) (36).

OCT2, sisplatinin absorpsiyonu için ana görevli taşıyıcıyken; MATE1, sisplatinin proksimal tubulden idrara taşınmasında (ekskresyon) rol alır (37). Bununla birlikte, cinsiyet farklılığı sisplatine bağlı akut böbrek hasarı için belirleyicidir ve sisplatin nefrotoksitesisi büyük oranda erkek sıçanlarda gösterilmiştir. Bu da proksimal tübül hücrelerindeki OCT2'nin dişilerde daha az eksprese edilmesiyle açıklanmıştır (38). Bu arada hipomagnezeminin OCT2 üretimini provoke ettiği, bunun da sisplatinin böbreğe alımını artırdığı görülmüştür (39). Birçok klinik çalışmadan elde edilen verilere göre; magnezyum replasmanının proksimal tübül hücrelerindeki OCT2 ekspresyonunu baskılayarak sisplatin nefrotoksitesisini iyileştirdiği/önlediği saptanmıştır (39). Bundan dolayı; magnezyum takviyesi (8-16 mEq) ile birlikte kısa süreli ve düşük volümlü hidrasyon, sisplatinin neden olduğu renal hasarı önlemek için günümüzde halen kullanılmaktadır (21). Sisplatinin ekstraselüler biyotransformasyonu, ilaç renal epitel hücrelerinin apikal yüzeyine ulaşır ulaşmaz başlar. Sisplatin nefrotoksitesisinin ilk basamağı, dolaşımda glutatyon konjugatları oluşumudur (glutatyon-S-transferazın aracılık ettiği bir reaksiyon ile). Glutatyon konjugatları böbreğe girdikten sonra, GGT (gamaglutamiltranspeptidaz) tarafından proksimal tübül hücreleri yüzeyinde sisteinil-glisin konjugatlarına dönüştürülür.



Şekil 3. Sisplatin kaynaklı epitelyal hücre ölüm yolları. “Sisplatin, böbrek epitel hücrelerine OCT2 ve daha az da Ctr1 aracılığıyla girer. Sisplatin hem mitokondiyal hem de mitokondri dışı apoptoz ve nekroz yollarını aktive eden serbest oksijen radikalleri üretimine, nükleer ve mitokondriyal DNA hasarına neden olur” (31)

Sisteinil-glisin konjugatları, yine proksimal tübül hücre yüzeyinde bulunan aminopeptidazlar tarafından sistein konjugatlarına metabolize edilirler . Bu sistein konjugatları ise proksimal tübül hücrelerine alınarak, sistein-s-konjugat beta-liyaz tarafından yüksek derecede reaktif tiyollere dönüştürülürler (40).

3.2.4.2. Proksimal tübüle alınımlı ve birikim

Renal hasarın büyük bir kısmı, proksimal tübülün S3 segmenti denilen böbrek medullasının kortekse yakın kısmında meydana gelir. Proksimal tübül epitel hücrelerindeki sisplatin akümülyasyonu, kandaki sisplatin konsantrasyonunun beş katıdır (41). İntraselüler olarak en yüksek sisplatin konsantrasyonu sitozol, mitokondri, nükleus ve mikrozomlarda görülür. Proksimal tübül epitel hücrelerindeki

sisplatin toksisitesi morfolojik olarak; tübüler nekroz, mikrovillus kaybı, lizozomlarda sayı ve boyut değişikliği ve mitokondiyal vakuolizasyon olarak kendini gösterir. Bu yapısal değişikliklere birçok organelin fonksiyon bozuklukları da eşlik eder. Bu arada, iki belirgin patofizyolojik mekanizma, hücresel hasarın ana tetikleyicileri olarak göze çarpmaktadır;

- 1- protein sentezinin inhibisyonu
- 2- glutatyon deplesyonu

Bunlarla beraber; mitokondriyal hasar, membran transport proteinlerinin inhibisyonu ve lipid peroksidasyonu hücre hasarının göstergeleri olarak ortaya çıkar (42).

3.2.5. Sisplatin sitotoksitesi

3.2.5.1. Sisplatinin hücresel hedefleri

Platin bileşiklerinin toksik etkilerini DNA ile etkileşime geçerek ortaya çıkardıkları düşünülüyor. Hücre içi gibi aköz (sulu) bir ortamda, sisplatinin klorid ligandları su tarafından eklenir ve pozitif yüklü bir elektrofil ortaya çıkar. Bu elektrofil; DNA, RNA ve diğer protein bileşkeleri oluşturacak intraselüler makromoleküllerin nükleofilik yüzleriyle etkileşir (43). Sisplatin hızlı çoğalan hücrelerde DNA'ya bağlanarak, sarmaliçi ve sarmallararası çapraz bağlar oluşturur ve DNA sentezini ve replikasyonunu durdurur (44). Bu da sisplatinin DNA hasarı üzerinden antitümör etkisini açıklar (45). Buna karşın Mandic ve arkadaşları, çekirdeği çıkarılmış hücrelerin sisplatin nedenli apoptozunun DNA hasarı gelişmeksizin ortaya çıkabildiğini göstermişlerdir (46). Bazı yayınlar, mitokondri DNA'sının ya da diğer mitokondriyal yapıların, sisplatine bağlı hücre ölümünde DNA hasarından daha önemli olabileceğine işaret etmişlerdir (47). Pozitif yüklü sisplatin, negatif yüklü olan mitokondride kolaylıkla birikebilir. Buna göre; bazı hücrelerin sisplatine olan duyarlılığı, o hücrelerdeki mitokondri yoğunluğuna ve mitokondri membran potansiyeline bağlı olduğu düşünülebilir (48). Proksimal tübül

hücreleri, böbrekteki en yoğun mitokondri içeriğine sahip hücreler oldukları için, bu yaklaşım, bu hücrelerin sisplatin toksisitesine neden daha duyarlı olduklarını açıklayabilir (49).

3.2.5.2. Sisplatinin neden olduğu böbrek hasarının patofizyolojisi

Düşük molekül ağırlıklı ve yüksüz sisplatin glomerülden serbestçe süzülerek medulla ve kortekste bulunan proksimal tübül segmentlerinde en yüksek seviyeye ulaşır (42). Zaten bu bölgeler sisplatinin neden olduğu böbrek hasarının en çok görüldüğü alanlardır (50). Bu hasar, patofizyolojik olarak dört tiptir; vasküler hasar (vazokonstriksiyon), glomerüler hasar (kapillerler, bazal membran, podositler, mezengiyal hücreler, parietal hücreler), tubuler toksisite (apoptoz ya da nekroz) ve interstisyel hasar (inflamatuvar yanıtla bağlı hasar) (42)

3.2.5.3. Sisplatin kaynaklı hücre siklus değişimleri ve hücre ölümü ile ilgili moleküler mekanizmalar

Sisplatin nefrotoksitesisi doz bağımlıdır ve böbrek hücrelerinin nekroz, apoptoz ve nekroptozu ile ilişkilidir (51). İn vitro çalışmalar, nekrotik hücre ölümünün yüksek doz sisplatin ile gerçekleşirken, apoptozun ise düşük doz sisplatin ile ortaya çıktığını göstermiştir (52).

Sisplatin; sitokrom c, apoptoz indükleyici faktör (AIF) ve endonükleaz G salınımı ile sonuçlanan kaspaz3, kaspaz8 ve kaspaz9'un aktivasyonuna ve Bax geninin mitokondriye translokasyonuna neden olur (52,53). Nekroz ve apoptoza ek olarak sisplatin tedavisinde nekroptoz* da gözlenmiştir.

*Nekroptoz Nedir?: Morfolojik olarak nekroza, mekanizma olarak apoptoza benzeyen bir hücre ölüm yolıdır. Anahtar morfolojik özellikleri; hücre ve organellerin şişmesi ve plazma membran rüptürüdür. Mekanizması ise genetik olarak programlanmış sinyal iletimi olayları (genetically programmed signal transduction events) ile tetiklenir. Mekanizma şu algoritma ile özetlenebilir: Tümör nekroz faktörü (TNF), Tümör nekroz faktörü reseptörü1 (TNFR1)'i uyarır. RIP1 (receptor interacting protein), RIP3 ve kaspaz-8 TNFR1'e sitozolik yüzeyde bağlanır ve kompleks oluştururlar.

Eğer bu kompleks kaspaz 8'i aktive ederse apoptoz başlar; eğer kaspaz 8'i aktive edemezse nekrozom oluşur. Nekrozom ise birçok tümör ile ilişkilidir. Nekroptozun işlev gördüğü birkaç klinik durum; kemik büyüme plaklarının kapanması, reperfüzyon hasarı, akut pankreatit, steatohepatit, Parkinson hastalığı (Şekil 3)

3.2.6. Sisplatin toksisitesinde apoptotik yollar

Sisplatine bağlı renal epitel hücre ölümünde birçok apoptotik yolak tanımlanmıştır. Bunlar; TNF reseptörleri ve Fas gibi hücre ölüm reseptörlerini içeren ekstrinsik yolak, intrinsik mitokondriyal yolak ve endoplazmik retikulum stres yolağıdır (54).

3.2.6.1. Sisplatin ve kaspazlar (ekstrinsik yolak)

Kaspazlar, hem in vitro hem de in vivo olarak sisplatin nedenli renal epitel hücre ölümüne neden olduğu bilinen apoptoz sürecinde önemli rol oynayan hücre ölüm proteazları ailesidir (55). Hem p53 nedenli kaspaz-6 ve kaspaz-7'nin uyarılması (56) hem de p53 bağımsız kaspazların Bax/Bak eksenli sitokrom c salınımı sonucu uyarılması, sisplatinin tübüler epitelyum hücrelerini öldürmesine katkıda bulunur (55).

Ligandlar, hücre membranı üzerindeki ölüm reseptörlerine bağlanarak kaspaz-8'i aktive ederler. Bu da diğer kaspazları aktive ederek apoptozu indükler (57). Bilinen en önemli ölüm reseptörleri; Fas, TNF-alfa ve TNF reseptör (TNFR) 1 ve 2'dir. Sisplatin bu ölüm reseptörlerini indükler. Tsuruya ve arkadaşları; TNFR1 ve Fas'tan yoksun bırakılmış renal epitel hücrelerinin sisplatin nedenli hücre ölümüne karşı dirençli olduklarını (54), Seth ve arkadaşları; sisplatinin, kaspaz-8 aktivitesini artırdığını (58), Takeda ve arkadaşları ise kaspaz-8 inhibisyonunun sisplatin nedenli hücre ölümünü azalttığını (59) in vitro deneylerle göstermişlerdir.

3.2.6.2. Sisplatin ve intrinsik mitokondriyal yolak

Renal epitel hücrelerinin sisplatine maruziyeti Bax'ın mitokondriye translokasyonu ile sonuçlanır ve kaspaz-2 aktivasyonu, sitokrom-c ve endonükleaz-G gibi maddelerin mitokondriden salınması, kaspaz-9 aktivasyonu gibi basamakları içinde bulunduran apoptozun intrinsik mitokondriyal yolağı aktive olmuş olur (60-62).

3.2.6.3. Sisplatin ve endoplazmik retikulum stres yolağı

Endoplazmik retikulum stres yolağı, kaspaz-12 ve kalsiyum bağımlı fosfolipaz A2 aktivasyonu ile ilişkilidir ve bu enzimlerin inhibisyonu sisplatin nedenli apoptozu azaltır (63,64).

3.2.6.4. Böbrek hücre hasarı ve hücre siklusu düzenleyicileri

Böbrek hücre hasarında, hücre siklus düzenleyicileri de özel bir rol oynar (65). Akut böbrek hasarında birçok stabil böbrek hücresi hücre siklusuna katılır. Hücre siklusu, cdk2 gibi siklin bağımlı kinazların aktivasyonu ve inhibisyonu ile kontrol edilirler (66). Bir cdk inhibitörü olan p21, sisplatin tarafından upregüle edilir (etkinliği artırılır) ve sisplatin toksisitesine karşı koruyucu bir rol üstlenir (66). p21'in aşırı uyarımı, sisplatin nedenli apoptozu inhibe ederken (in vitro), p21 gen defektli farelerin sisplatinin böbrek hasarına daha yatkın oldukları (in vivo) gösterilmiştir (66). p21, hücre siklusunu durdurarak bir bakıma hücrelere sisplatinin neden olduğu DNA hasarını tamir etmek için zaman kazandırır (66).

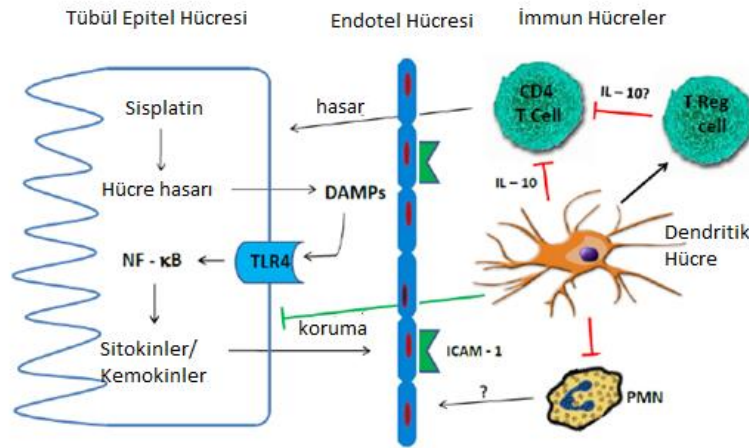
3.2.6.5. Sisplatin nefrotoksitesisi ve p53

p53, sisplatin nedenli hücre ölümünün ana mediyatörü olarak bilinir. p53, tümör baskılayıcı etkisini, hücre siklus aresti ya da apoptozu uyararak gerçekleştirir (DNA hasarı, hipoksi ve onkogen aktivasyonuna yanıt olarak) (67). Sisplatinin,

böbrekte (in vivo) (68) ve tübül epitel hücrelerinde (in vitro) (58) p53'ü uyardığı gösterilmiştir. p53'ün farmakolojik ya da genetik inhibisyonunun, sisplatinin neden olduğu kaspaz aktivasyonu, apoptoz indüksiyonu ve renal hasarı in vivo ve in vitro azalttığı gösterilmiştir (69). p53'ün transkripsiyon regülasyonundaki iki hedefi; PUMA-alfa (p53 upregulated modulator of apoptosis alfa) ve PIDD (p53 induced protein with a death domain), sisplatin nedenli hücre ölümünde p53 aktivitesini düzenlerler. PUMA-alfa, sisplatin tarafından p53 bağımlı olarak indüklenen bir proapoptotik proteindir (70). p53'ün sisplatine bağlı olarak aktivasyonu kaspaz-2'yi uyatarak AIF (apoptosis inducing factor)'nin mitokondriden salınımına neden olan PIDD'yi uyarır (71).

3.2.7. Sisplatin nefrotoksitesinde inflamasyon

Sisplatin nefrotoksitesinde inflamasyon, direkt selüler toksisiteye ek olarak giderek artan bir önem kazanmaya başlamıştır. Son yirmi yılda, inflamatuvar renal hasarda rol alan bir dizi mediatör tanımlanmıştır (72).



Şekil 4. Sisplatin nefrotoksitesinin immün mekanizması. “Renal epitel hücre hasarı DAMPs (damage-associated molecular patterns) salınmasına neden olur. Bu da TLR4 (tool-like receptor 4)’ü aktive eder. TLR4 aktivasyonu, içinde TNF-alfa’nın da bulunduğu birçok kemokin ve sitokin

üretimine neden olur. Bu kemokin ve sitokinler, adezyon moleküllerini aktive ederek nötrofil ve T hücreler gibi inflamatuvar hücreleri hasar bölgesine çeker. Dokuda yerleşik dendritik hücreler IL-10 üreterek (anti-inflamatuvar sitokin) böbrek hasarını azaltmaya çalışırlar. Treg (regulatuvar t hücreleri) hücreleri de böbrek hasarını azaltır (mekanizma bilinmiyor). Dendritik hücrelerin, Treg hücrelerinin sayı ve aktivitesini artırdığı düşünülüyor” (72).

3.2.7.1. Sisplatin hasarlı böbreklerde sitokin ağı

Sisplatin tedavisi nedeniyle ortaya çıkan renal inflamasyon, sisplatin hasarlı proksimal tübül hücreleri ya da böbreğin kendi immun hücreleri tarafından üretilen inflamatuvar ve immün süpresif sitokinler arasındaki karmaşık etkileşim ile kontrol edilir. İnflamatuvar sitokinler arasından TNF-alfa, sisplatin nedenli inflamatuvar yanıtta merkezi role sahiptir (73).

3.2.7.1.1. Sisplatin nefrotoksisitesinde TNF-alfa

TNF-alfa'nın esas rolü, diğer inflamatuvar sitokin ve kemokinlerin üretimini stimüle etmek ve inflamatuvar hücreleri hasarlı hücreye çağırmaktır (74). TNF-alfa, adezyon moleküllerini renal endotel hücrelerinde çoğaltır ve dolaşan lökositlerin enflame böbrek parenkimine girmesini sağlar (75,76). Selektinler ve integrinlerden ICAM-1 (interselektin adezyon molekülü), TNF-alfa tarafından sisplatin hasarlı böbreğe immun hücrelerin göçünü sağlayan en önemli komponenttir (77).

TNF-alfa, birçok enfeksiyöz ve inflamatuvar hastalıkta başrolde olan prototipik bir inflamatuvar sitokindir. Anti-TNF tedavileri; psöriyazis, romatoid artrit ve inflamatuvar barsak hastalıkları gibi belirgin inflamatuvar hastalıklarda yaygın olarak kullanılır. Deng ve arkadaşlarının (78) yaptığı fare çalışmasında, sisplatin nefrotoksisitesinde TNF-alfa'nın renal ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir. TNF-alfa, birçok immun ve non-immun hücre tarafından üretilir. Bunu göstermek için Zang ve arkadaşları (79) kimerik bir fare oluşturarak kemik iliğini çıkarmış ve yerine wild-type TNF-alfa knockout denilen özel bir fare türünün kemik iliğini yerleştirmişler. Wild-type kemik iliği verilen kimerik farelerin böbreklerinde, sisplatin tedavisinden sonra immun kaynaklı olmayan bir böbrek hasarının geliştiğini görmüşlerdir. Ayrıca bu farelerde; çok hafif bir renal yetmezlik, az bir renal histolojik hasar ve düşük kan-idrar TNF-alfa seviyeleri gözlenmiştir. Tüm bu sonuçlar

gösteriyor ki; sisplatin uygulamasından sonra dolaşımdaki ve idrardaki TNF-alfanın önemli bir kısmı, non-immün hücrelerden ve muhtemelen renal epitel hücrelerden kaynaklanıyor olabilir (80). Ayrıca sisplatin nefrotoksisitesinde rol aldıkları için sitokinler bu konuda diagnostik değere sahiptir.

Dendritik hücreler; immun sistemin bekçileri gibidirler ve kararlı durum şartlarında, TGF-beta (81) ve IL-10 (82) ve Treg hücrelerini uyarak toleransı devam ettirirler. Dendritik hücreler böbrekte tubulointerstisyel kompartman boyunca yoğun bir iletişim ağı kurmuş vaziyettedirler (83). Dendritik hücrelerin iskemik renal hasar süresince TNF-alfa ürettikleri gösterilmiştir (84).

3.2.8. Sisplatin ve otofaji

Otofaji de sisplatin nedenli hücre hasarında rol oynar. Otofaji; hasarlı organellerin, protein agregatlarının ve diğer makromoleküllerin sitoplazmada biriktiği bir hücresel süreçtir. Renal epitel hücrelerinin sisplatin ile tedavisi, otofajik proteinlerin ekspresyonuna ve otofagozomların oluşumuna yol açar (85,86). Otofajinin inhibisyonunun apoptozu artırdığı görülmüş ve bu da otofajinin sisplatine karşı hücre cevabında koruyucu rolü olduğunu gösteriyor (85,86).

3.2.9. Sisplatin nefrotoksisitesinin klinik yansımaları

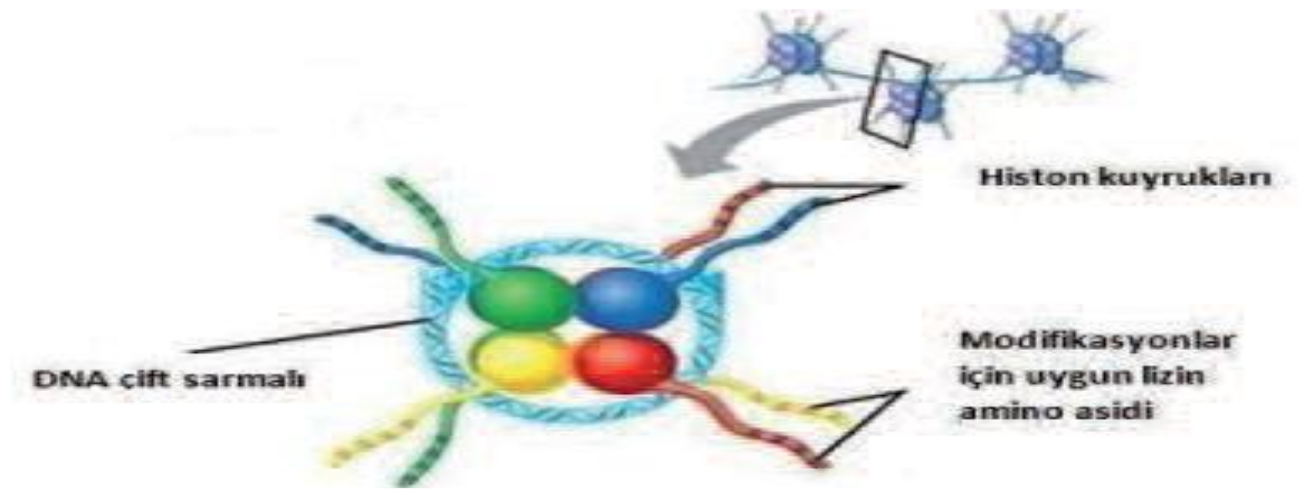
Sisplatin nefrotoksisitesi; akut böbrek yetersizliği (en önemli yan etki), hipomagnezemi, fankoni benzeri sendrom, distal renal tubuler asidoz, hipokalsemi, renal tuz kaybı ve hiperürisemi (üre-kreatinin yüksekliği) gibi klinikle karşımıza çıkabilir (2). Lipid peroksidasyonunun en önemli ürünlerinden olan malondialdehit (MDA), hücre membranlarından iyon alış-verişine etki ederek membrandaki bileşiklerin çapraz bağlanmasına yol açar ve iyon geçirgenliğinin ve enzim aktivitesinin değişimi gibi olumsuz sonuçlara neden olur. MDA, DNA'nın nitrojen bazları ile reaksiyona girebilir ve bundan dolayı mutajenik, hücre kültürleri için genotoksik ve karsinojeniktir (87).

3.2.9.1. Sisplatin tedavisinde böbrek koruyucu yaklaşımlar

Salin ile hidrasyon ve sisplatin tedavisi öncesinde, esnasında ve sonrasında mannitol uygulaması, sisplatin nefrotoksisitesini belirgin oranda düşürmede yaygın kabul görmüş uygulamalardır (88). Tedavi esnasında NaCl'ün fayda mekanizması tam olarak bilinmemektedir ancak salin ile veya hipertonic salin ile volüm genişlemesi böbrekten sisplatin ekskresyonunu (salınımını) artırabilir. Bununla birlikte, tuz yüksek konsantrasyonda Cl⁻ iyonu sunar, bu da sisplatin molekülünden Cl⁻ iyonlarının ayrılmasını önleyerek sisplatinin reaktif formuna dönüşmesini azaltır (89). Ayrıca salin hücreyi ozmotik strese sokarak sisplatinin DNA'ya ulaşmasını azaltır, proksimal tübül hücrelerinin apoptotik yolağa direncini artırır ve nefrotoksinlerin metabolik etkinliklerini değiştirir. Tüm bunlar sisplatinin yan etkilerine karşı koruyucudur ancak sisplatinden beklenen tümörisidal etkiyi de azaltacağından tedavi mantığına ters düşmektedir (24).

3.3. Histonlar

3.3.1. Histonların yapısı



Şekil 5: Histonların amino ucu kuyrukları ve nükleozomun iç yapısı (92)

Histonlar, ökaryotik hücrelerde DNA ile iyonik bağ yapmak suretiyle birleşerek nükleozom yapısını oluşturan basit bazik karakterde proteinlerdir (90,91). Her histon, yapısal etki alanı ve yapısal olmayan terminal amino kuyruğundan oluşmaktadır (91). Histon proteinlerinin amino ucu kuyrukları, nükleozom dışına doğru uzanmakta ve protein-protein etkileşimine, dolayısıyla histon modifikasyonlarına olanak sağlamaktadır (92).

Nükleozomların dışına doğru uzanan amino kuyrukları; fosforilasyon, metilasyon ve asetilasyon gibi çeşitli posttranslasyonel modifikasyonlar için uygun bir alan oluşturlar (93).

3.3.2. Histonların posttranslasyonel modifikasyonları

DNA'nın nükleotid dizisindeki bir değişimden kaynaklanmayan ancak fenotipte meydana gelen kalıtılabilir değişiklikler epigenetik değişimler olarak adlandırılmaktadır. Posttranslasyonel histon modifikasyonları kromatinin epigenetik düzenleyicileridir. Bu modifikasyonlar, histon-histon ve histon-DNA etkileşimlerinde rol alarak kromatin yapısını modifiye ederler. Kromatine özgü histon modifikasyonları, genomda transkripsiyonel olarak “aktif ökromatin” ve “sessiz heterokromatin” bölgeler oluşmasına olanak sağlar (94,95).

3.3.2.1. Histonların asetilasyonu

Kromatinin temel birimi olan nükleozom, DNA'nın etrafına sarılmış dört çekirdek histonun (H3, H4, H2A ve H2B) meydana getirdiği bir oktamerden oluşur (Luger ve ark., 1997) (Şekil 5). Özellikle, nükleozomun yüzeyindeki N-terminal kuyruklarında bulunan lizinlere asetil gruplarının eklenmesiyle gelişen histon asetilasyonu, aktif transkripsiyon ile ilişkilidir (Hebbes ve ark., 1988). Histon kuyruklarındaki lizinlerin asetilasyonu ile meydana gelen yük nötralizasyonu DNA ve histonlar arasındaki elektrostatik çekimi gevşetir ve transkripsiyonu kolaylaştırır (Davie ve Chadee, 1998).

3.3.2.2. Histon asetiltransferaz (HAT) ve histon deasetilaz (HDAC) enzimleri

HAT'ler ve HDAC'ler, hedef proteinler üzerindeki spesifik lizin kalıntılarının ϵ -amino grubunun sırasıyla asetilasyonunu ve deasetilasyonunu gerçekleştirir. Bir asetil grubunun eklenmesi, lizin amino grubu üzerinde pozitif yüklerin oluşumunu engeller ve bu nedenle protein aktivitesini etkileyebilir. Bu tersine çevrilebilir katalitik olay sayesinde, HAT'ler ve HDAC'ler transkripsiyonu iki genel yolla düzenleyebilir: 1) kromatin yapısını ve kromatine transkripsiyonel düzenleyici proteinlerin (96,97) erişilebilirliğini modüle ederek 2) transkripsiyonu doğrudan düzenleyen histon olmayan substratların aktivitesini değiştirerek (98). Asetilasyon geri dönüşlü olarak gerçekleşen bir olaydır. Lizin aminoasidinin asetil grubunun çıkarılması ile kromatin tekrar kondanase olmakta ve transkripsiyon baskılanmaktadır (99). HAT ve HDAC enzimleri, histon olmayan proteinleri asetilleyerek veya asetil gruplarını uzaklaştırarak hücrede önemli etkilerde bulunmaktadır. Protein kararlılığı, protein-protein etkileşimi, protein yerleşimleri, DNA'ya bağlanma yetenekleri bu etkiler arasındadır (100). HAT ve HDAC arasındaki denge, hücrelerin gen regülasyonunun düzenlenmesinde önemli rol oynamaktadır. HAT aktivitesinde azalma ya da HDAC aktivitesindeki artış, hücrelerin malign dönüşümünde rol oynamaktadır (101).

3.3.3. Histon deasetilaz inhibitörleri (HDACi)

HDACi; histon asetilasyonunu sağlayarak bazı genlerin ifadesini değiştirebilmekte ayrıca transkripsiyon faktörleri ve tümör baskılayıcı proteinler gibi histon olmayan bazı proteinlerin asetilasyonunu artırarak biyolojik aktiviteleri etkilemektedir. HDACi uygulanarak histonların deasetilasyonu engellenmekte, histon asetilli halde kalmakta ve transkripsiyonun sürekliliği sağlanmaktadır (8). Potansiyel ilaç hedefi olmaları nedeniyle tıbbi açıdan önemli olan HDAC enzimlerini inhibe edebilen moleküller geliştirilmiştir. Bu moleküller; hidroksamatlar, siklik tetrapeptidler ve kısa zincirli yağ asitleridir (5,102).

Histon deasetilaz inhibitörleri (HDACi), anti-kanser ajanlar olarak geliştirilmişlerdir. Yüksek konsantrasyonlarda bu ajanlar renal epitel hücrelerde apoptozu indükler (6)

3.3.3.1. HDACi'nin etki mekanizması

HDACi, birçok transforme ya da kanser hücre tipinde apoptozu ve diferansiyasyonu tetikleyerek hücre siklusunun G1 ve G2 fazında durmasına neden olur ve proliferasyonu inhibe ederler (9). HDACi'nin antitümöral aktivitesindeki dikkat çekici bir durum histon asetilasyonunun sadece belli genlerin transkripsiyonunu (eksprese edilmiş genlerin %2'si) aktive etmesi ve tümör büyümesini inhibe etmesidir. En çok uyarılmış genlerden birisi, hücre siklusu kinaz inhibitörü olan p21WAF genidir (10). HDACi'nin kullanılması sonucu p21 promotör bölgesindeki H3 ve H4 histonlarının asetilasyonu gerçekleşir ve p21 geninin ekspresyonu artar (11). Normal hücreler, HDAC inhibitörleri ile tedaviye daha dirençliken (103), tümör hücrelerinde hücre büyümesini durdurur, hücre farklılaşmasını ve hücre ölümünü inhibe eder. HDACi'nin etki mekanizmasının, epigenetik ve posttranslasyonel modifikasyon seviyelerinde değişen gen ekspresyonu ve histon olmayan proteinlerdeki değişikliklerle ilişkili olduğu düşünülmektedir. Birçok tümör hücre hattında, HDAC inhibitörleri hücre siklusu geni p21'in yukarı doğru regülasyonuna (reseptör sayısında artma) neden olarak siklin/cdk komplekslerini bloke eder, hücre döngüsü durmasına yol açar ve diferansiyasyonu bloke eder (104,105). HDACi; transkripsiyonel etkilerinin yanı sıra, kanser hücrelerinde hücre döngüsünün inaktif olan G2 kontrol noktasını aktif hale getirerek, hücre bölünmesini durdurmakta ve apoptozu uyarmaktadır (12,13). HDACi ile yapılan in vivo çalışmalar, bu bileşiklerin tümör büyümesini ve metastazı önemli ölçüde azalttıklarını göstermiştir. Örneğin; kısa zincirli yağ asitlerinden bütirik asit ve türevleri, kolon ve prostat kanserleri ile endometrial ve servikal kanserlerde çalışılmış ve bu maddelerin kanserli hastalarda hücre siklusunu etkileyerek bölünmeyi durdurdukları, farklılaşma ve apoptozu uyardıkları gösterilmiştir (106). HDACi'ni tercih edilir kılan özelliklerinden biri de diğer tedavi yaklaşımlarını optimize etme yetenekleridir. HDACi; kemoterapi modellerindeki retinoik asitler, D

vitamini analogları ve peroksizom proliferatör aktive edici reseptör gama (PPAR-gama) ligandları gibi ilaçların etkilerini artırabilirler (107). HDACi'nin hücre bölünmesi, hücre siklus ilerlemesi, apoptoz, hücre iskeleti modifikasyonları ve anjiyogenezi içeren geniş çaptaki hücresel işlevleri modifiye etme yetenekleri bulunmaktadır. Bu ilaç grubunun böyle bir anahtar rol oynamasının iki büyük nedeni; var olan sitostatiklerin (retinoidler gibi) etkisini iyileştirme ve kanser tedavisine yeni terapötik yaklaşımlar katarak hastalığa neden olan belirli genlerin transkripsiyonunu hedefleme yetenekleridir (108,109).

Bugüne kadar iki HDACi FDA tarafından kutanöz T hücreli lenfoma tedavisinde kullanılmak üzere onay almıştır. Bunlar, vorinostat (suberoylanilid hidroksamik asit-SAHA) ve romidepsin (FK228)'dir (14). HDACi, HDAC'nin katalitik bölgesinde bulunan çinko (Zn) atomunu doğrudan etkileyerek inhibisyona neden olur (inhibisyonun gerçekleşmesi için çinko atomu gerekmektedir) (110).

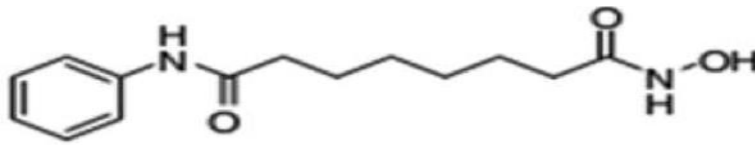
3.3.3.2. HDACi tipleri

HDAC inhibitörleri, sadece birkaç HDAC tipine (HDAC izoform seçici inhibitörler) karşı spesifik olarak etki edebilir, fakat aynı zamanda tüm HDAC tiplerine (pan-inhibitörleri) karşı da etki edebilir. HDAC inhibitörleri, beş bileşik sınıfının üyeleri olarak sınıflandırılabilir: (I) hidroksamik asitler (hidroksamatlar; vorinostat, trikostatın vs.); (II) kısa zincirli yağlı (alifatik) asitler; (III) benzamidler; (IV) siklik tetrapeptidler; ve (V) sırasıyla pan-inhibitör nikotinamid ve spesifik SIRT1 ve SIRT2 inhibitörleri sirtinol ve cambinol dahil sirtuin inhibitörleri (15).

Trikostatının siklin bağımlı kinaz (CDK) inhibitörü olan p21 geninin promotörünü aktive ederek tümörlü hücrenin büyümesini durdurduğu, hücre döngüsünü etkilediği, hücresel ve mitokondriyel yollar üzerinden apoptozu indüklediği bilinmektedir (111).

3.3.3.3. Vorinostat (Suberoilanilid hidroksamik asit)

Vorinostat, yapısal olarak hidroksamat grubuna ait bir histon deasetilaz (HDAC) inhibitörüdür. Bu gruptaki diğer ilaçlar arasında Givinostat, Abexinostat, Panobinostat, Belinostat ve Trichostatin A bulunur. Bunlar, potansiyel anti-neoplastik aktiviteye sahip acil ilaç sınıfında kabul edilirler. Bu ilaçlar, genetik mutasyon dışında, HDAC enzimlerindeki değişikliğin hücrelerde fenotipik ve genotipik ekspresyonu etkilediği ve bunun da bozulan homeostaz ve neoplastik büyümeye yol açığının anlaşılmasıyla geliştirilmişlerdir (112). FDA tarafından kutanöz T hücreli lenfoma (CTCL) için onaylanan ilk HDACi olan vorinostat (suberoylanilid hidroksamik asit) (Mann ve ark., 2007) derinin skuamöz hücreli karsinomuna karşı da etkilidir. Vorinostat; renal hücreli karsinom, mantle hücreli lenfoma, malign melanom, meme, prostat ve akciğer kanseri ve gibi çeşitli kanserlere karşı kapsamlı bir şekilde değerlendirilmiştir (Butler ve ark. 2000; Facchetti ve ark. 2004; Komatsu ve ark 2006; Mahalingam ve ark. 2010; Xargay-Torrent ve ark. 2011; Uehara ve ark. 2012) (113). Vorinostat; 1. (HDAC1, HDAC2 ve HDAC3) ve 2. Sınıf (HDAC6) HDAC enzimleri üzerindeki inhibe edici etkisi sayesinde; doku düzeyinde immun yanıt modülasyonu, anjiyogenez inhibisyonu, hücresel düzeyde farklılaşma, aggrezom oluşumu, hücre motilitesi, apoptoz ve hücre siklusunun devamı gibi biyolojik süreçler üzerinde çeşitli etkilere sahiptir. Güçlü bir HDACi olan vorinostatın, radyasyon terapisi ve antineoplastik ajanlarla kombine kullanımı uygun görülmektedir. Her iki tedavi şeklinde de normal hücreler üzerinde toksisitenin az olduğu saptanmıştır ve hücresel süreçlerde spesifik biyolojik etkileri mevcuttur. Diğer kanser terapileri (radyasyon, kinaz inhibitörleri, sitotoksik maddeler ve ayırt edici maddeler dahil olmak üzere) ile vorinostatın kombinasyon halinde aktivitesi üzerine yapılan çalışmalarda, çeşitli insan transforme kültür hücrelerinde sinerjistik etkisi gözlemlenmiştir (16).



Şekil 6. Vorinostatın moleküler yapısı

3.3.3.4. Vorinostat ve otofaji

Vorinostat; mikromolar konsantrasyonlarda renal tübül hücrelerinde hücre ölümünü uyarırken, daha düşük dozlarda sisplatin nedenli apoptoza karşı koruyucu etki gösterir (114-116). Otofaji; bozulmuş organellerin ve protein agregatlarının elimine edildiği lizozomal degradasyon yolağıdır. Açlığa adaptasyon, intraselüler protein ve organel temizliği, hücre büyümesi/gelişmesi, anti-aging, mikroorganizmaların eliminasyonu, hücre ölümü, tümör süpresyonu ve antijen prezentasyonu birer otofaji örneğidir (117,118). İskemik ve nefrotoksik akut böbrek hasarında otofaji, tubuler hücre hasarına karşı devreye girer (119). 2018 yılında yapılan bir çalışmada; vorinostat ve trikostatatinin renal tübül hücrelerinde otofajiyi uyardığı gösterilmiştir (120). Ayrıca, vorinostat ve trikostatatinin sisplatin toksisitesinde hücre iyileşmesini artırdığı gösterilmiştir (20). Vorinostat ve trikostatatinin, sisplatin tedavisi süresince DNA hasar cevabını baskıladığı, sisplatin nedenli tübül hücre apoptozunda önemli bir sinyal yolağı olan p53 aktivasyonunun süpresyonu ile gösterilmiştir (20). Patschan ve arkadaşları, vorinostatın endotelial progenitör hücrelerde TGF- β tanın otofaji inhibitör etkisini ortadan kaldırdığını göstermiştir (121). Gelecek vadeden antikanser ajanlar olarak HDACi, sisplatin gibi diğer birçok antikanser ajanlarla sinerjistik ve aditif tümör öldürücü etki göstermektedir (122). Renal hasarı önlemek için HDACi'ni kullanırken, sisplatinin antikanser etkisini olumsuz etkilememesi çok makul bir tedavi stratejisi olarak kendini gösterir (20). Vorinostat tübül hücrelerindeki sisplatin nedenli apoptozu azaltırken, HCT116 kolon kanser hücrelerinde sisplatin tedavisinde apoptozu artırmıştır (in vitro). Bu çalışma in vivo olarak HDACi'nin sisplatin ile birlikte kullanılırken bir yandan nefroprotektif bir yandan da antikanser etki edebileceğine işaret etmektedir (20).

3.3.3.5. Vorinostatın antiinflamatuvar etkileri

Vorinostat, HDAC enziminin in vivo ve in vitro geri gönüslü inhibitörüdür (123). HDACi, asetile edilmiş H3 ve H4 histonlarının akümüasyonunu artırarak direkt olarak kromatinin ve dolayısıyla nükleozomun gen düzenleyici faktörlerle olan

ilişisini düzenler (124). HDACi'nin insan PBMC (periferik insan mononükleer hücreleri)'de lipopolisakkarit (antijen) nedenli TNF-alfa, IL-1beta, IL-12 ve IFN-gama'yı inhibe ettiği gösterilmiştir (Böbreğin mezengiyal hücreleri, glomerülde bulunan hem vazoaaktif hem de immünolojik olarak aktif olan özelleşmiş hücrelerdir. Bu hücreler; 1- Glomerüler hemodinamiğin regülasyonu ile ilişkili özelleşmiş düz kas hücreleri gibi davranır 2- Ekstraselüler matrix üreterek glomerüler yumağa yapısal destek sağlar 3- Fagositik özelliklerinden dolayı immun kompleksler gibi makromoleküllerin alımını ve temizlenmesini sağlarlar. Makrofajlara benzer şekilde; lipopolisakkarit, IFN-gama ve IL-1betaya yanıt olarak nitrik oksit, süperoksit ve diğer inflamatuvar medyatörleri üretirler) (125,126). Bir çalışmaya göre; vorinostat in vitro olarak mezengiyal hücrenin inflamatuvar medyatör üretimini bloke eder. Bu çalışmadaki in vivo vorinostat dozları Butler ve arkadaşlarının yaptığı çalışmadan alınmıştır. Buna göre; 25 ya da 50 mg/kg vorinostat H3 veH4 total asetilasyonunu artırmıştır (123).

3.3.3.6. Vorinostatın farmakokinetiği

Vorinostatın ileri evre kanser hastalarında kısa süreli uygulamalarda iyi tolere edildiği gözlenmiştir. 22 günlük ardışık uygulamadan sonraki plazma konsantrasyonunun, tek dozluk plazma konsantrasyonuna benzerlik gösterdiği kaydedilmiştir. İnsanda 400 mg oral dozun yarılanma süresi 1,34 saattir. %71 oranında plazma proteinlerine bağlanır. Başlıca bağlandığı protein albümindir. Eliminasyonu başlıca metabolizma yoluyla olur. Metabolizması glukuronidasyonla ve beta oksidasyonun takip ettiği hidroliz ile olur. İdrarla %1'den az miktarda atılır. O-glukuronid ve 4-anilino-4-oksabutanik asit olmak üzere iki inaktif metaboliti vardır (127).

3.3.3.7. Vorinostatın farmakodinamiği

Vorinostatın en sık karşılaşılan doz kısıtlayıcı toksisite göstergeleri; %8,2 dehidratasyon, %8,2 anoreksi, %6,8 yorgunluk, %4,1 diyaredir. Vorinostatın en sık rapor edilen yan etkileri; %89,0 yorgunluk, %72,6 hiperglisemi, %71,2 mide

bulantısı, %60,3 anoreksi, %50,7 diyare, %69,9 düşük hemoglobin, %56,2 yüksek kreatin, %53,4 düşük platelet seviyeleridir. Tüm vorinostat dozlarında asetillenmiş histon H3 (AcH3) akümüasyonu kaydedilmiştir. Hem solid tümör hem de hematolojik maliniteye sahip hastalarda, vorinostat anti-tümör etkinlik göstermiştir (127).



4. GEREÇ VE YÖNTEM

4.1. Gereç

4.1.1. Kullanılan araç ve gereçler

Biopac MP30 amplifikatör (dört kanalda birçok parametrenin kayıt ve analizini yapar)

MAY WBC30-440C organ banyosu için su sirkülatör cihazı

MAY FDT-10A Force Displacement Transducer cihazı

Langendorff sistemi (MAY 0702)

Hassas terazi (Sartorius BP 121 S)

Vortex cihazı (Nüve NM 110)

Santrifüj cihazı (Thermo MicroCL 17R)

Çalkalayıcı (Stuart SSM4)

Elektroblot cihazı (Thermo Pierce Power Blot Cassette)

4.1.2. Kullanılan deney hayvanları

Çalışma Dicle Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun 20/10/2017 tarihli 4 nolu kararı ile etik kurul onayı almıştır. Dicle Üniversitesi Sağlık Bilimleri Uygulama ve Araştırma Merkezi (DÜSAM)'den temin edilen 32 adet Sprague-Dawley erkek rat kullanıldı. Çalışma süresince 'Hayvan Haklarının Korunması' hususundaki esaslara özenle uyuldu.

4.1.3. Kullanılan kimyasal maddeler

Vorinostat/SAHA (Cayman Chemicals)

Sisplatin (Koçak-farma)

Ketamin HCL (Ketalar 50 mg/ml,10ml flakon, Pfizer)

Ksilazin (Rompun %2, Bayer)

Heparin (Nevparin flakon 5.000 IU, Mustafa Nevzat)

Krebs-Henseleit solüsyonu

DMSO

Tablo 1. Krebs Henseleit solüsyonu

NACl	6,9 gr/L
NAHCO ₃	2,1 g/L
KCl	0,35 g/L
CaCl ₂	0,28 g/L
MgCl ₂	0,11 g/L
Na ₂ HPO ₄	0,12g/L
Glukoz	2 g/L

4.2. Yöntem

Sprague-Dawley erkek ratlar kullanılarak yapılan deneysel çalışmalar 4 grupta (n=8) gerçekleştirildi.

- 1. Kontrol grubu;** 1 ml salin enjeksiyonu i.p. yapıldı.
- 2. Sisplatin grubu;** tek doz 5 mg/kg sisplatin i.p. yapıldı. Beş gün sonra böbrekler izole edildi.

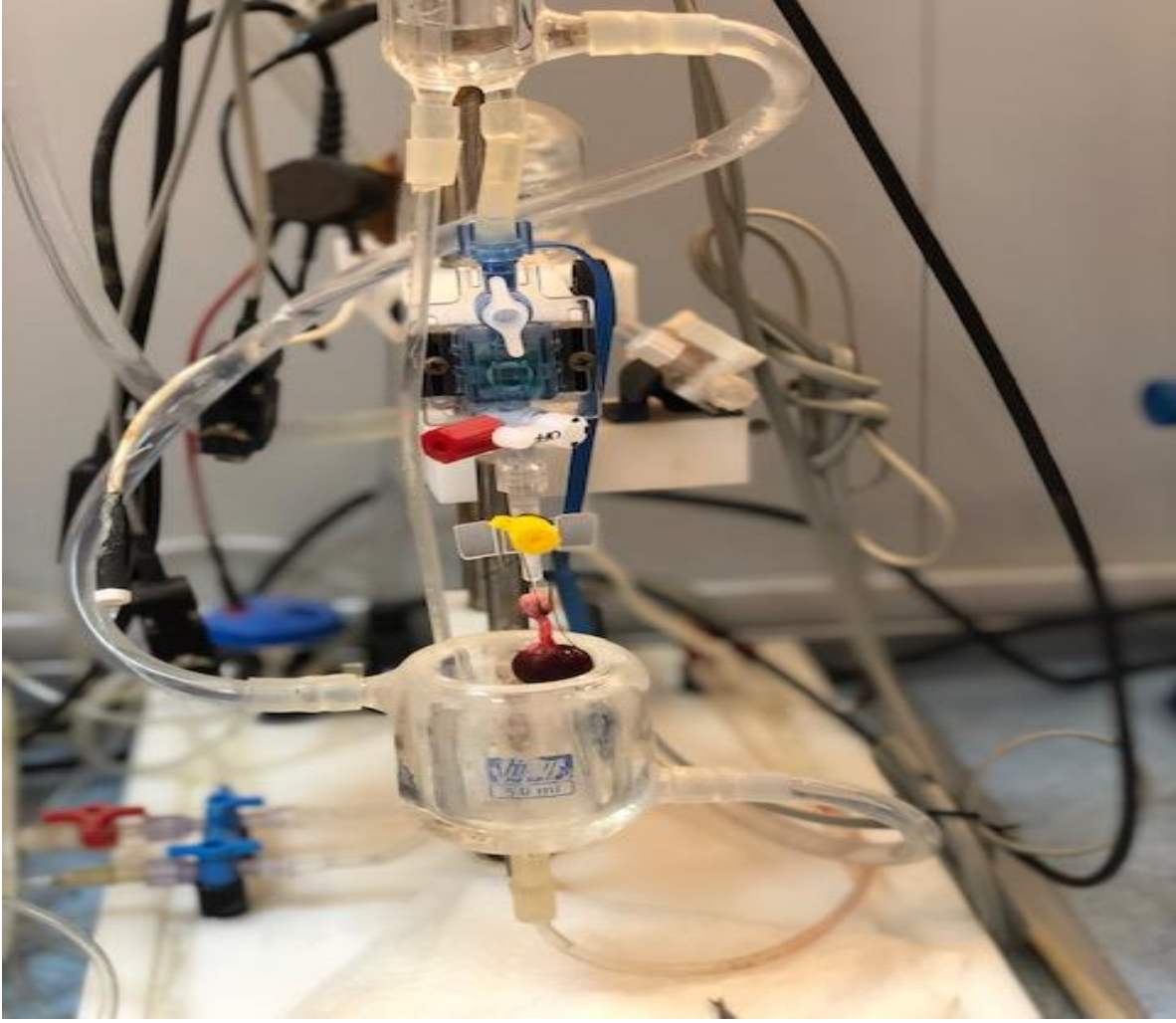
3. Sisplatin+vorinostat grubu; 24 saat arayla iki doz 50 mg/kg vorinostat i.p. yapıldı. Son vorinostat dozundan 6 saat sonra tek doz 5 mg/kg sisplatin i.p. yapıldı (123)

4. Vorinostat grubu; 24 saat arayla iki doz 50 mg/kg vorinostat i.p. yapıldı.

Tüm gruplarda son ilaç uygulanmasından 5 gün sonra anestezi altında laparotomi yapılarak böbrekler izole edildi. Sol böbrekler perfüzyon basıncı ölçümleri için Langendorff düzeneği ile perfüze edildi. Sağ böbrekler histopatolojik inceleme, Western-Blot analizleri ve MDA ölçümleri için kullanıldı. Histopatolojik incelemeler için doku örnekleri formolin içine alındı, biyokimya ve Western-Blot analizleri için ayrılan dokular -80⁰ C’de saklandı. Ratlardan kardiyak kan alınarak serum üre ve kreatinin düzeyleri ölçüldü.

4.2.1. Farmakolojik inceleme

Bütün gruplara anestezi amacıyla 100 mg/kg Ketamin + 15 mg/kg Ksilazin (i.m.) ve cerrahi işlemler sırasında oluşabilecek bir koagülasyonu önlemek amacı ile 500 IU/kg heparin (s.c.) uygulandı. Daha sonra ratlarda abdomen açıldı, karın ön duvarı geçilerek sol böbreğe ulaşıldı. Böbrekte herhangi bir mekanik hasar oluşturmamaya özen göstererek abdominal aort ve diğer damarlar kesilerek böbrek izole edildi. Buzlu krebs solüsyonu içerisine bırakılan ve kısa bir kanül ile renal arterden kanüle edilen böbrekler Langendorff sistemine asıldı (Resim 1). Peristaltik pompa yardımı ile sabit hızda 37 °C’de ısıtılan % 5 CO₂ ve % 95 O₂ karışımı ile havalandırılan Krebs Henseleit solüsyonu ile perfüze edildi. Renal basınç değişiklikleri bir basınç transduceri ile MP30 software sistemi ile (Biopac systems) kaydedildi. Perfüzyon basınçlarındaki değişiklikler gruplar arasında karşılaştırıldı. Her grupta sağ böbrekler biyokimyasal ve histopatolojik değerlendirmelerde kullanılmak üzere alındı.



Resim1. Langendorff düzeneğine asılmış rat böbreği

4.2.2. Biyokimyasal inceleme

Anestezi sonrasında tüm deneklerden 4 ml intrakardiyak kan alındı. 4000 rpmde 10 dk santrifüj edilerek plazma ayrıştırıldı. Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Merkez Biyokimya Laboratuvarı'nda tüm örneklerin üre ve kreatinin değerleri ölçüldü.

Tüm gruplarda izole edilen böbrek doku örneklerinde, doku MDA (malondialdehit) düzeyi ölçüldü. Lipid peroksidasyonunun göstergesi olan MDA tayini, tiyobarbitirik asit (TBA) yöntemi ile yapıldı. Sonuçlar dokular için nmol/gr olarak tanımlandı. Bu yöntemde tiyobarbitirik asit ile reaksiyon veren maddeler ölçülür ve literatürlerde TBARS olarak yer almaktadır (128). MDA ölçümü için -

80⁰'de saklanan böbrek parçaları her denek için buz sıcaklığında trikloroasetik asit (TCA) ile muamele edilerek homojenize edildi (1 gr doku başına 1 ml %10 TCA ve 8 ml %5 TCA daha eklenerek Ultra Turrax homojenizatörde homojenize edildi). Santrifüj işleminden sonra elde edilen süpernatanta aynı miktar %6 TBA ilave edilerek 100⁰C'ye kadar 10 dakika ısıtıldı. Absorbsiyon spektrumu 480-600 nm aralığında kaydedildi. MDA ölçümünün standardı olan 1,1,3,3-tetraetoksipropan ile aynı koşullarda çalışıldı. Sonuç MDA konsantrasyonları 532 nm dalga boyunda Jordan ve Scenkman tarafından bildirilen molarite katsayısı ($1,56 \times 10^5$) kullanılarak hesaplandı (129).

4.2.3. Histopatolojik inceleme

Doku spesimenleri 48 saat boyunca %10'luk formalinde fikse edildi. Otomatik doku takibi cihazı ile (Thermo, Excelsior AS) standart histolojik doku takibi süreci sonrasında dokular döküm cihazında (Thermo, Histostar) parafine gömülerek bloklama işlemi yapıldı. Bloklardan mikrotom cihazı ile (Leica, RM2245) 4-5 mikrometre kalınlığında kesitler alındı. Kesitler, deparafinizasyon işlemini takiben otomatik boyama cihazında (Shardon, Varistain Gemini) Hematoksilen-Eozin (H&E) ile ve otomatik histokimya cihazında (Ventana, Bench Mark special stain) Periodic Acid-Schiff (PAS) ile standart metodlara göre boyandı. Histopatolojik değerlendirme için preparatlar ışık mikroskobu ile (Nikon, Eclipse 50i) incelendi.

4.2.4. Western-Blot analizi

Bütün gruplarda izole edilen böbreklerden alınan doku örneklerinde TNF-alfa, p21 ve PUMA-alpha (p53 up-regulated modulator of apoptosis alpha) düzeyleri western-blot analizi ile tayin edildi.

4.2.4.1 Kullanılan gereçler

1- TNF-alfa primer antikoru (abcam-#ab6671)

- 2- p21 primer antikoru (abcam-#ab109199))
- 3- PUMA-alfa antikoru (abcam-#ab9643)
- 4- Beta actin antikoru (abcam-#ab8227)
- 5- Sekonder antikor (Goat anti-rabbit IgG) (abcam #6721)
- 6- Acrylamide/Bis-acrylamide (%30/%0.8 w/v) (SIGMA #A3699)
- 7- TBST tablet (SIGMA-#91414)
- 8- TEMED (SIGMA #T9281)
- 9- Tris HCl (SIGMA #T3253)
- 10- Sodium dodecyl sulfate (SDS) (SIGMA-#L3771)
- 11- Glycine (Sigma-#G8898)
- 12- T-PER doku protein ekstraksiyon reaktifi (Thermo-#78510)
- 13- Halt proteaz ve fosfotaz inhibitör karışımı (Thermo-#78442)
- 14- Protein kuantifikasyon reaktifi (Pierce 660 nm Protein Assay Reagent-#22260)
- 15- Trizma Base (SIGMA #93362)
- 16- 1 step Transfer buffer (Thermo-#84731)
- 17- Sample buffer (Laemmli 2x concentration-#S3401-10 vl)
- 18- Page Ruler Plus Prestained Protein Ladder (Thermo-#26620)
- 19- Hızlı elektroblotlama sistemi (Thermo G2 Fast Blotter)(Thermo FP-94060103)
- 20- Poliviniliden florür transfer membranı (GVS-#1212639)
- 21- Filtre kağıdı (Thermo-#84783)
- 22- Dikey elektroforez sistemi (Thermo OWL-P8DS-1)
- 23- Elektroforez güç kaynağı (Thermo OWL-EC300XL2)

- 24- Nanodrop cihazı (Thermo 2000/2000c)
- 25- Isıtıcılı manyetik karıştırıcı (VELP ARE Aluminum)
- 26- iBright Western-Blot görüntüleme sistemleri (Thermo Fisher CL-1000)
- 27- Homojenizatör (Thermo FSR-FB50220)
- 28- ECL Kit (Thermo-#32106)
- 29- Hassas terazi (Sartorius BP 121 S)
- 30- Yatay çalkalayıcı (Stuart SSM4)
- 31- Otomatik pipetler (Eppendorf)
- 32- pH metre (METTLER TOLEDO S220-K)

4.2.4.2 Kullanılan tampon ve çözeltilerin hazırlanışı

2mg/ml BSA stok çözeltisi

20 mg bsa 10 ml tper ve halt karışımı ile karıştırıldı

%2 agaroz solüsyonu

2 gr agaroz 100 ml saf suda çözündü

0,5 M tris HCl solüsyonu pH 6,8

3,94 gr tris hcl saf su ile 50 ml tamamlandı ve 0,1 N HCl ile ph 6,8'e ayarlandı

1,5 M Tris HCl solüsyonu pH 8,8

11,82 gr tris hcl saf su ile 50 ml tamamlandı ve 0,1 M NaOH ile ph8,8'e ayarlandı

%10 APS (amonyum persülfat) solüsyonu

10g aps 100 ml saf su

%10 SDS

SDS 10 gr 100 ml saf suda çözüldü

Yürütme tamponu (Transfer Buffer)(10x)

Tris base 30 gr

Glisin 144 gr

SDS 10 gr

Distile su ile 1000 ml'ye tamamlanarak çözündürüldü

TBST (Tris-buffered saline with 0.1% Tween ® 20 Detergent) çözeltisi(1X)

Hazır TBST tableti 500 ml distile suda çözüldü.

Bloklama solüsyonu

5 gr yağsız süt tozu TBST çözeltisi (1x) 100 ml ile karıştırıldı.

4.2.4.3 Doku örnekleme

Dondurma

Dokular denekten alınır alınmaz saf su ile yıkandı, parafilme sarıldı, işaretlendi ve -80°C'de muhafaza edildi.

Doku homojenizasyonu

Doku homojenizasyonu ve protein ekstraksiyonu için T-PER doku protein ekstraksiyon reaktif kiti ve HALT proteaz ve fosfataz inhibitör karışımı kullanıldı. Yapılan tüm işlemler kit prosedürüne bağlı olarak gerçekleştirildi. İşlemden önce 1:20 oranında T-PER ve HALT karışımı buz üzerinde (50 mg doku için 1ml T-PER ve 1 ml T-PER ile 10µl HALT) pipetle karıştırıldı ve buz üzerinde bekletildi. Sıçanlardan alınan böbrek dokuları -80°C'deki derin dondurucudan alınarak oda sıcaklığında ve buz üzerinde çözünmeye bırakıldı. Her numuneden yaklaşık 50'şer µg doku ependorfflara nakledildi ve her ependorffa daha önce hazırlanan TPER ve

HALT karışımından 1010 µl eklendi. Ultrasonik homojenizatör ile her ependorff 15 saniye homojenize edildi ve 15 saniye buz üzerinde bekletildi, bu döngü en az 3 kere tekrarlandı. +4°C’de 13000 rpm 20 dk santrifüj edildi. Süpernatant yeni ependorff tüplere alındı. Elde edilen örnekler -80°C’de saklandı.

Total protein kuantifikasyonu (Pierce 660 nm Assay Kiti)

Total protein kuantifikasyonu için Thermo Pierce 660 nm Assay kiti kullanıldı. Yapılan tüm işlemler kit prosedürüne bağlı olarak gerçekleştirildi. İşlemden önce 2mg/ml stok BSA (albümin standardı) solüsyonundan 10 ml hazırlandı. Seyreltici olarak T-PER ve HALT karışımı kullanıldı. Stok çözeltiden tablodaki hacimler kullanılarak seri dilüsyon yapıldı, ve standartlar hazırlandı.

Tablo 2. BSA standartlarının hazırlanması için kullanılan şema

	Çözücü Hacmi	BSA'nın hacmi ve kaynağı	Final BSA konsantrasyonu
A	0 µl	stoktan 300µl	2000µl/ml
B	125µl	stoktan 375µl	1500µl/ml
C	325µl	stoktan 325µl	1000µl/ml
D	175µl	B'den 175µl	750µl/ml
E	325µl	C'den 325µl	500µl/ml
F	325µl	E'den 325µl	250µl/ml
G	325µl	F'den 325µl	125µl/ml
H	400µl	G'den 100µl	25µl/ml
I	400µl	0	0µl/ml

Daha sonra kit prosedürüne uygun olarak, hem numunelere hem de standartlara 1:7,5 oranında Pierce 660 nm protein kuantifikasyon reaktifi eklendi (150µl Pierce 660 nm reaktife 20µl numune ya da standart). Oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edildi ve nanodrop cihazı ile standartların ve numunelerin 660 nm’deki absorpsiyonları ölçüldü. Konsantrasyonları bilinen standartların yardımıyla numunelerdeki total protein miktarı hesaplandı.

4.2.4.4 SDS- PAGE (Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel) elektroforez

jele yüklenecek olan protein numunelerinin hazırlanması

Elde edilen nanodrop sonuçlarına göre her numunenin konsantrasyonu hesaplandı ve her kuyucuğa 20 µg total protein eklenecek şekilde aliquatlandı. Her numuneye 1:1 oranında sample laemlii buffer eklendi. Kaynar suda 5 dakika bekletildi. Kaynadıktan sonra 16000 rpm 5 dakika santrifüj edildi ve jele yüklemeye hazır hale getirildi.

SDS PAGE jelin hazırlanması, protein karışımlarının yüklenmesi ve yürütülmesi

Thermo marka Owl Duo P8DS-1 cihazı kullanıldı. Hazırlanan %2'lik agaroz jel, kasetlerin tabanına yüklendi ve polimerize olması için beklendi. Bu sırada 10 ml %15'lik ayırıcı jel tablodaki gibi hazırlandı. Her kasete 4,13 ml ayırıcı jel karışımı konuldu ve üzerine jelin hava ile temasını kesmek için distile su eklendi. Jelin iyice polimerize olması için 30 dakika bekletildi. Polimerizasyondan sonra jelin üzerine verilen su kurutma kağıdı ile uzaklaştırıldı. 5 ml % 5' lik yoğunlaştırıcı jel tablodaki gibi hazırlandı ve ayırıcı jelin üzerine pipetle döküldü. Bu işlemde hemen sonra, 10x10 0,8 mm aralıklı on dişli tarak yoğunlaştırıcı jel ile arasında hava kabarcığı kalmamasına dikkat edilerek yerleştirildi. Jelin polimerizasyonu için 30 dakika süre beklendi. Tankın iç çemberine uygun miktarda yürütme tamponu (running buffer) eklendi. Tarak dikkatlice jelden ayrıldı. İlk kuyucuğa 5 µl protein ladder ve geri kalan kuyucuklara 20 µl hazırlanan örnekten pipetlendi. Tankın dış çemberine de yürütme tamponu eklendi. Elektroforez cihazının kapağı anot ve katot uçlarının doğruluğu kontrol edilerek kapatıldı ve 40mA sabit akımla yaklaşık bir buçuk saat süreyle proteinlerin ayrışması işlemi gerçekleştirildi (Resim 5).

Tablo 3: Ayırıcı jelin içeriği

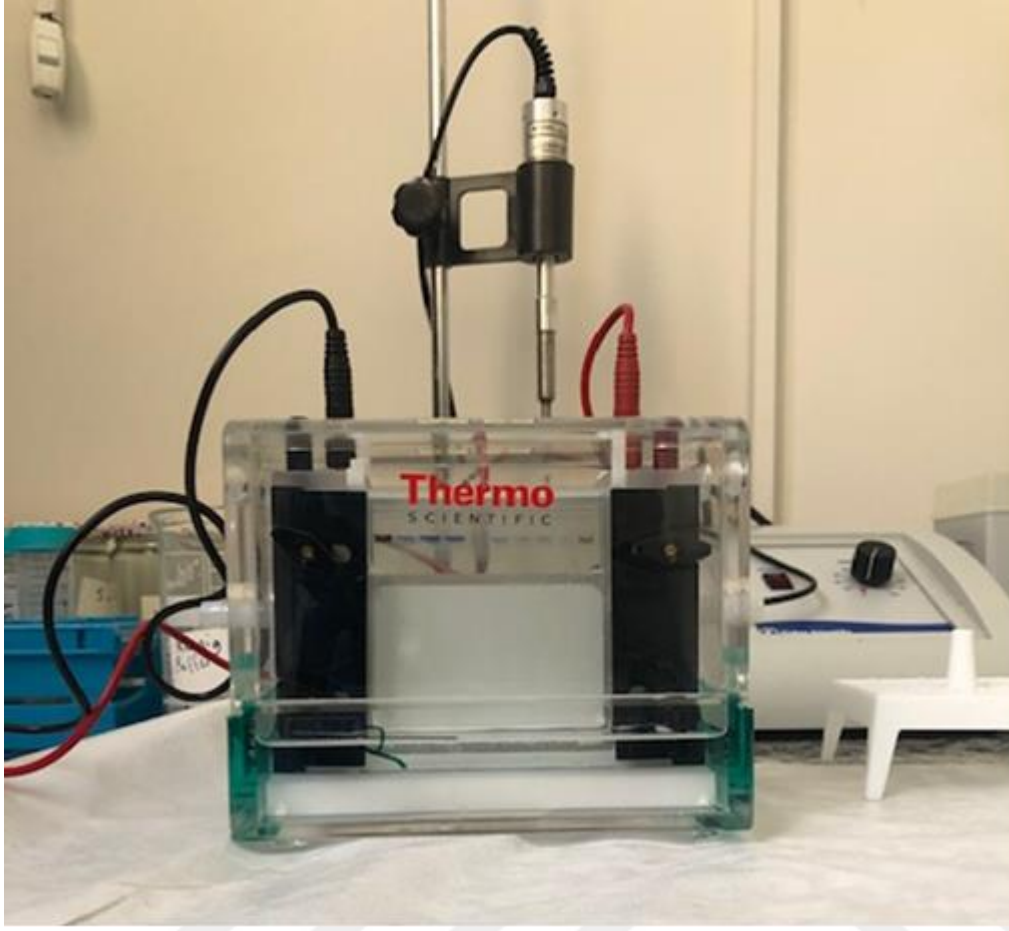
ddH ₂ O	2,2 ml
Akrilamid:Bisakrilamid	5 ml
1,5 M Tris HCl pH=8,8	2,6 ml
%10 SDS	0,1 ml
%10 APS	0,1 ml (100 µl)
TEMED	0,01 ml (10 µl)

Tablo 4: Yoğunlaştırıcı jelin içeriği

ddH ₂ O	2,975 ml
Akrilamid:Bisakrilamid	0,67 ml
0,5 M Tris HCl pH=6,8	1,25 ml
%10 SDS	0,05 ml (50 µl)
%10 APS	0,05 ml (50 µl)
TEMED	0,005 ml (5 µl)



Resim 2: Elektroforez düzeneğine numunelerin yüklenmesi



Resim 3: Proteinlerin 40 mA’de sabit akımla ayrıştırılması

Elektroblotlama işlemi

İlk olarak pvdf (Poliviniliden Florür) membranı metanol ile ıslatıldı. Her jel için 1 pvdf membran ve 4 filtre kağıdı 1. step transfer bufferda en az 5 dakika inkübe edildi.

Dikey elektroforez işleminden sonra jel kasetten çıkartıldı. Jel membrana aktarım kısmına geçmeye uygun hale getirildi. Fast blotter sisteminin kasetine her jel için önce 2 adet filtre kağıdı, sonra pvdf membran, sonra jel ve en son 2 filtre kağıdı sırasıyla üst üste yerleştirildi. Bu işlemlerde hava kabarcığı kalmaması için roller kullanıldı. Cihazımızın alt kapağı (anot) ve üst kapağı (katot) kontrol edildikten sonra kapatıldı ve fast blotter cihazında 7 dakikada proteinlerin membrana transfer sağlandı. Sürenin sonunda akım kesilerek membran çıkarıldı. Önceden boyanmış Low Range Marker’ın membranda görülmesi ile aktarımın yapıldığı kanıtlanmış oldu.

Bloklama işlemi

Öncelikle membranlar TBST tamponuyla oda sıcaklığında 5 dakika boyunca çalkalayıcı üzerinde yıkandı. Daha sonra 10 ml bloklama tamponu ile 1 saat boyunca çalkalayıcının üzerinde oda sıcaklığında inkübe edildi. Bloklama aşamasından sonra TBST tamponu ile üçer defa 5 dakika boyunca çalkalayıcı üzerinde yıkandı.

Primer ve sekonder antikorlarla inkübasyon ve diğer işlemler

Üretici firmanın tavsiyesi doğrultusunda bütün antikorlar 1:1000 oranında 10 ml bloklama çözeltisi ile seyreltildi ve hazırlanan karışım membranlara eklendi. +4⁰ C’de 20 saat boyunca çalkalayıcı üzerinde membranlarda inkübe edildi.

Ertesi gün membranlar 5 ml TBST solüsyonu ile beş dakika çalkalayıcı üzerinde yıkandı ve bu işlem 3 kere tekrarlandı. Daha sonra sekonder antikor 1:2000 oranında 10 ml bloklama tamponunda hazırlandı. Ve hazırlanan karışım membranlara eklendi ve oda sıcaklığında 1 saat çalkalayıcı üzerinde inkübe edildi. Son olarak TBST tamponu ile üç defa beşer dakika çalkalayıcı üzerinde yıkandı.

Protein bantlarının görüntülenmesi ve protein ekspresyon düzeylerinin belirlenmesi

Bu aşamada Thermo ECL kit kullanıldı ve yapılan tüm işlemler kit prosedürüne bağlı olarak gerçekleştirildi. Her membran için toplamda 7,5 ml ECL solüsyonu hazırlandı, membranların üzerine eklendi ve oda sıcaklığında 1 dk inkübe edildi. Thermo Fisher CL 1000 (ibright Western-blot görüntüleme sistemi) kullanılarak bant görüntüleri elde edildi. Protein bant yoğunlukları IMAGE-J (National Institute of Health, Bethesda, ABD) Analysis Software programında analiz edildi. Veriler β -Aktin housekeeping proteinine karşı normalize edildi.

4.2.5. İstatistiksel değerlendirme

Elde edilen veriler aritmetik ortalama $\pm$ standart sapma olarak ifade edildi. İstatistiksel analizler SPSS programı kullanılarak yapıldı. Gruplar arası farkı değerlendirmek amacı ile Kruskal Wallis testi uygulandı. İki grup arasındaki fark ise

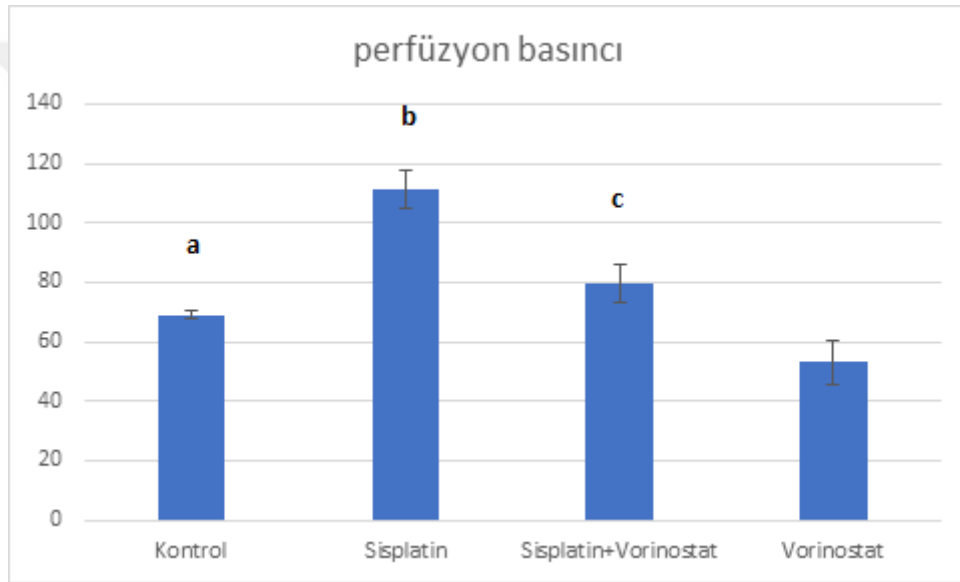
Mann-Whitney U testi kullanılarak yapıldı. Tüm istatistiksel analizlerde anlamlılık düzeyi $p<0.05$ olarak kabul edildi.



5. BULGULAR

5.1. Farmakolojik bulgular

Langendorff sistemi ile perfüze edilen böbreklerden elde edilen perfüzyon basınç değerlerinin, Sisplatin grubunda Kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde arttığı ($p<0,05$), Vorinostat+Sisplatin grubunda ise Sisplatin grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde azaldığı görüldü ($p<0,05$). (Şekil 7)



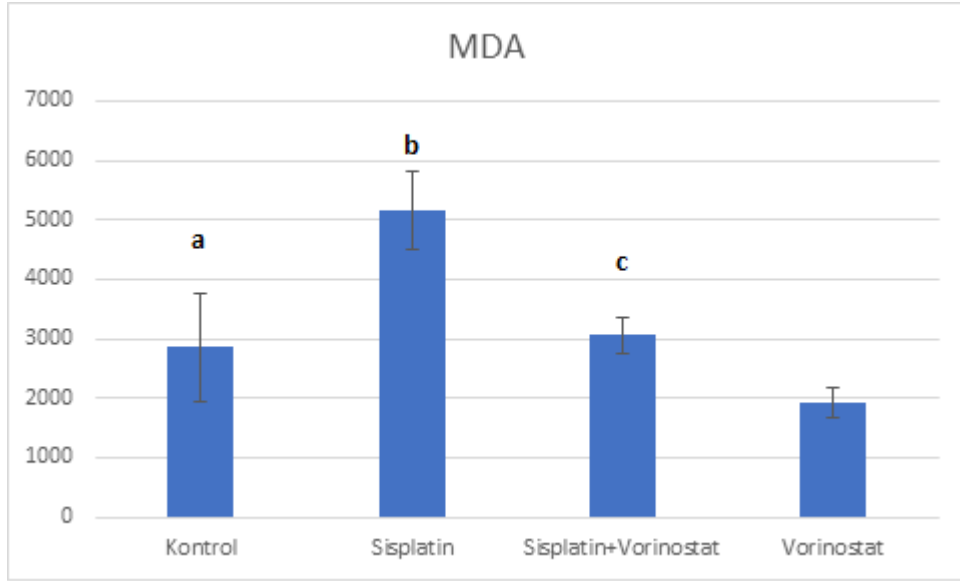
Şekil 7. Bütün gruplarda böbrek perfüzyon basınç değişimleri (mm/Hg) (n=8) (a-b $p<0,05$, b-c $p<0,05$)

5.2. Biyokimyasal bulgular

Serum üre ve kreatinin düzeylerinin Sisplatin grubunda Kontrol grubuna göre anlamlı olarak arttığı, Vorinostat+Sisplatin grubunda ise Sisplatin grubuna göre anlamlı olarak azaldığı görüldü ($p<0,05$).

Böbrek dokularında ölçülen MDA değerlerinin Sisplatin grubunda Kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttığı ($p<0,05$), Vorinostat+Sisplatin

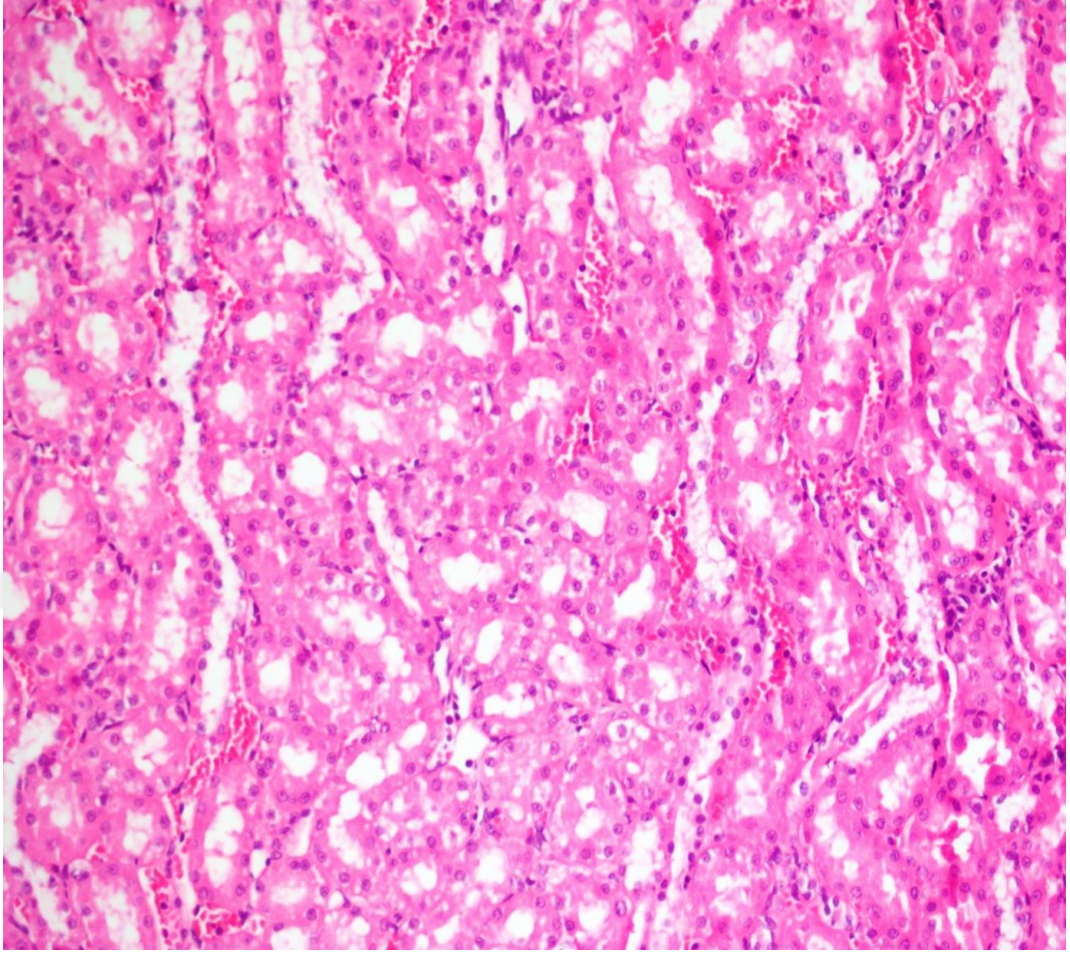
grubunda ise Sisplatin grubuna göre anlamlı olarak azaldığı görüldü ($p<0,05$) (Şekil 8).



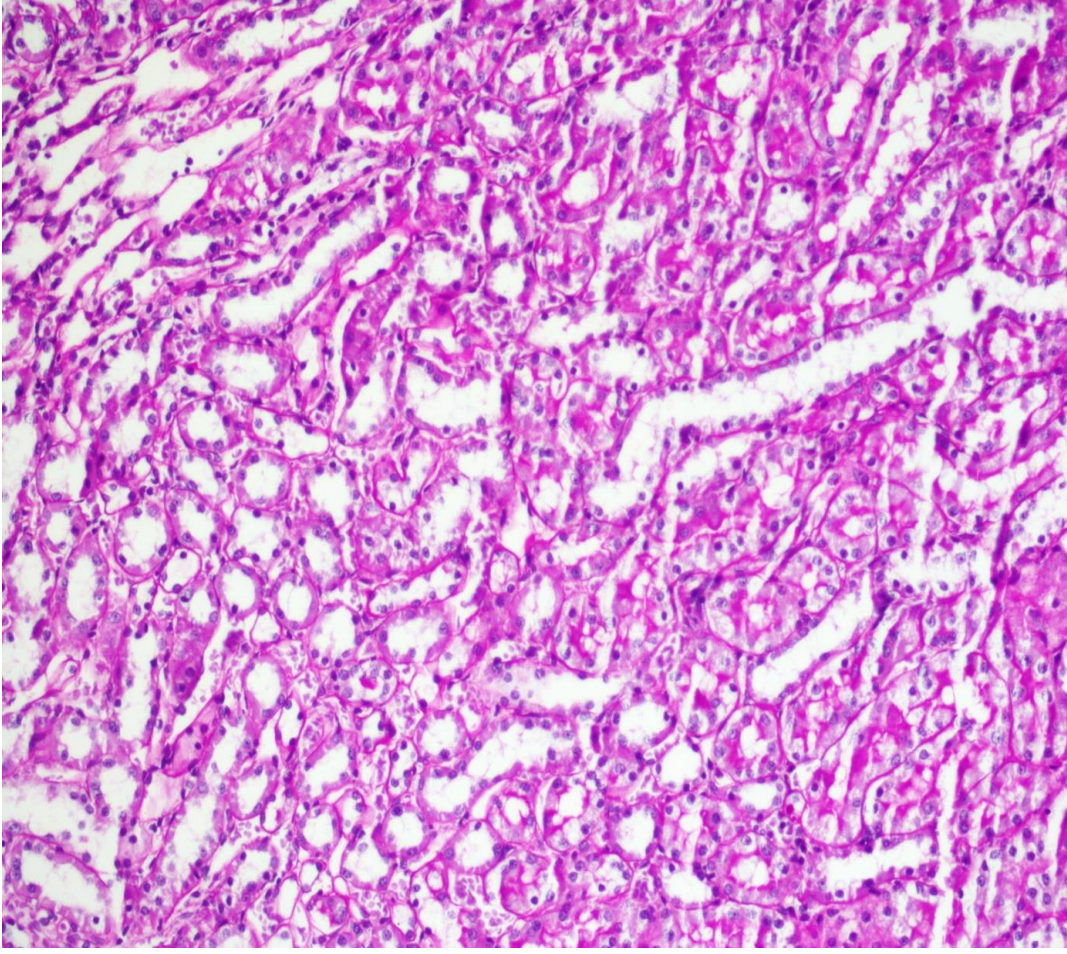
Şekil 8. Bütün gruplarda MDA düzeyleri (nmol/gr) (n=8) (a-b $p<0.05$, b-c $p<0.05$)

5.3. Histopatolojik bulgular

Kontrol grubu: Kontrol grubuna ait incelemede normal histolojik yapılar izlendi. Glomerül yapısı, proksimal ve distal tübüllerin histolojik açıdan normal ve fırçamsı kenar yapılarının korunmuş olduğu görüldü (Resim 4 ve Resim 5)

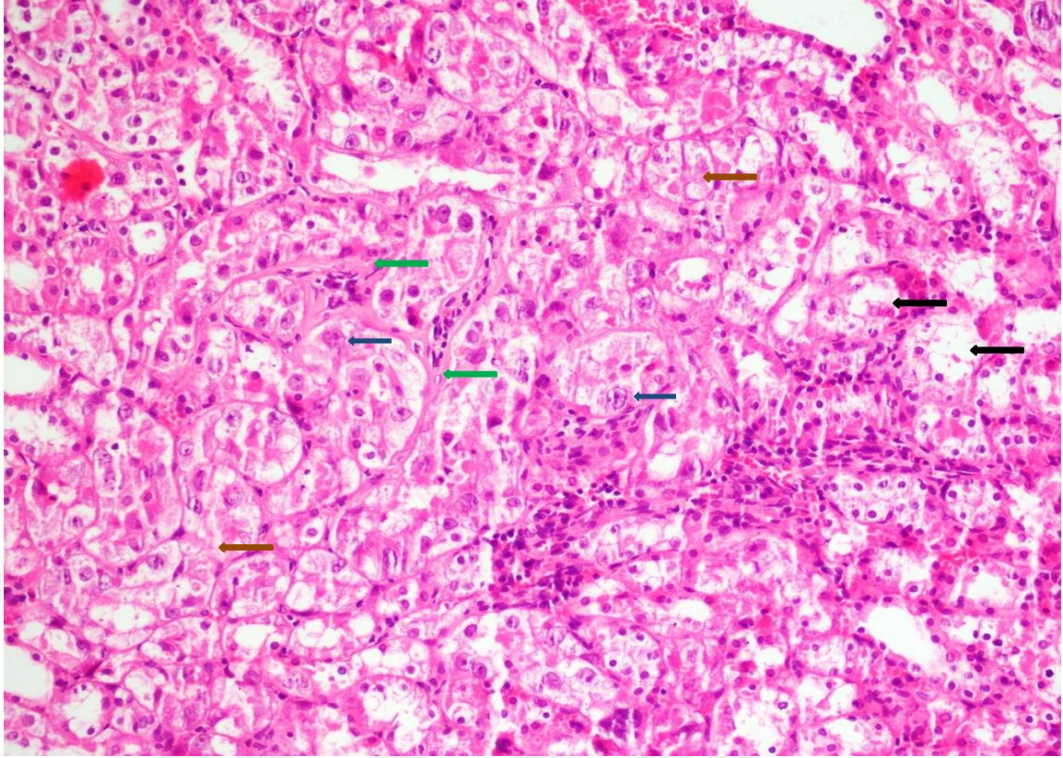


Resim 4: Kontrol grubu. Korunmuş tübüler organizasyon (H&E, 20x10)

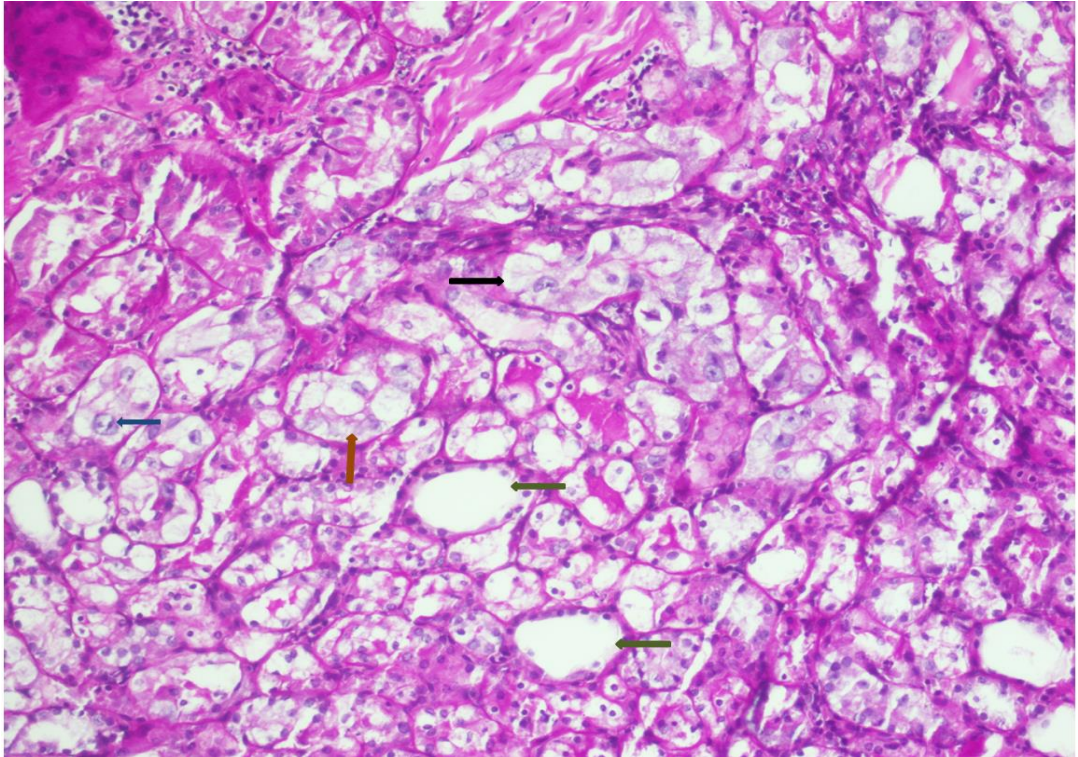


Resim 5: Kontrol grubu. Korunmuş fırçası kenar (PAS, 20x10)

Sisplatin grubu: Sisplatin grubunda yapılan incelemede böbrekte bütünlüğün bozulduğu görüldü. Tübüler epitelde nükleus kaybı ile karakterize prenekrotik değişiklikler, tübül epitel hücresi nükleuslarında belirgin rejeneratif değişiklikler, tübül bazal membranında yer yer kalınlaşma (Resim 6) ve tübül epitellerinde fırçası kenar kaybı, tübül epitellerinde nükleus kaybı (prenekrotik değişiklikler) (Resim 7) gibi belirgin yapısal değişiklikler izlendi.

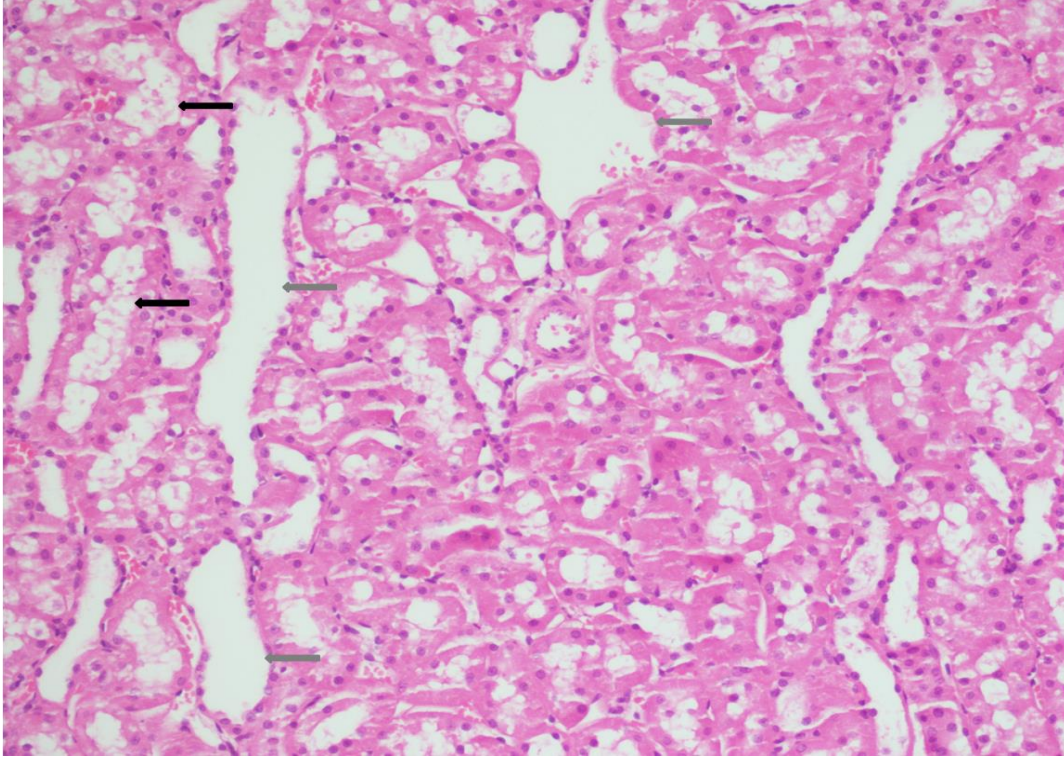


Resim 6: Sisplatin grubu. Siyah ok: Tübül epitellerinde nükleus kaybı ile karakterli prenekrotik değişiklikler, Lacivert ok: Tübül epitel hücresi nükleuslarında belirgin rejeneratif değişiklikler, Yeşil ok: Tübül bazal membranında yer yer kalınlaşma (H&E, 20x10)

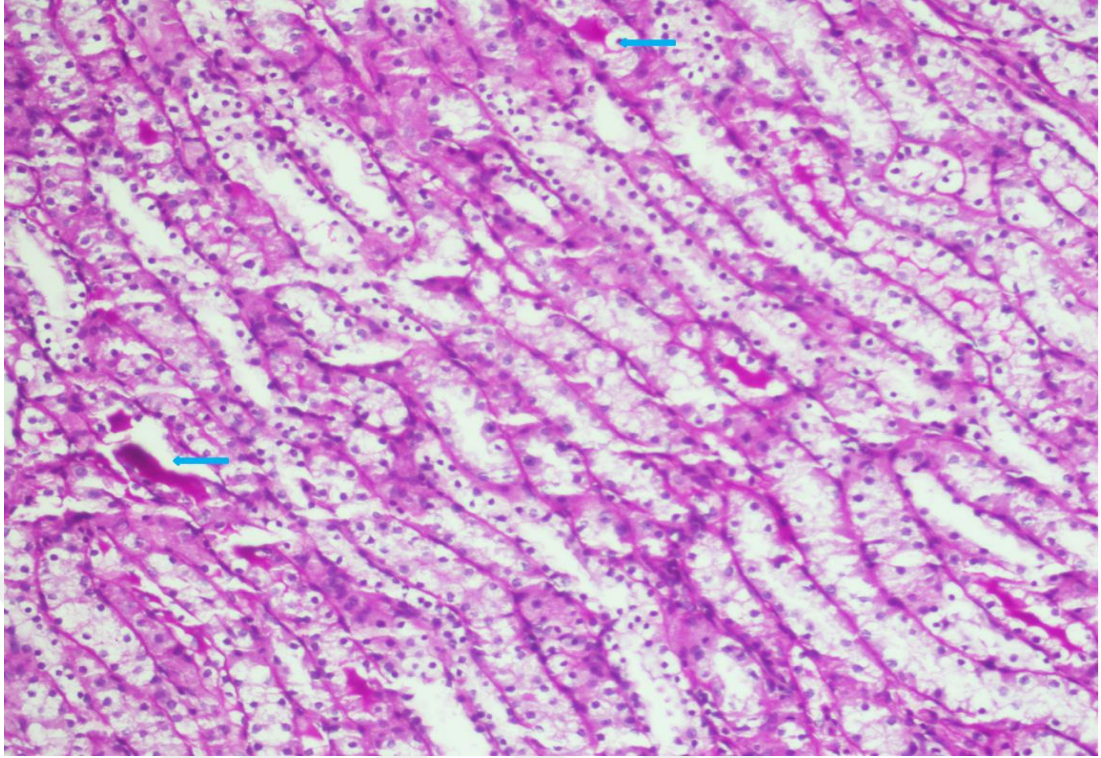


Resim 7: Sisplatin grubu. **Koyu yeşil ok:** Tübül epitellerinde fırçamsı kenar kaybı, **Kahverengi ok:** Tübül epitellerinde nükleus kaybı (prenekrotik değişiklikler) (PAS, 20x10)

Vorinostat+Sisplatin grubu: Bu grupta yapılan incelemede sisplatine bağlı olarak bozulan bütünlüğün +vorinostat ile korunduğu görüldü. Hafif tübüler dilatasyon, tübül epitellerinde hafif hidropik dejenerasyon, hafif eozinofilik dejenerasyon (Resim 8) ve fokal tübüler cast formasyonu, tübüler organizasyon ve tübül epitelyum hücrelerinin korunduğu izlendi (Resim 9).

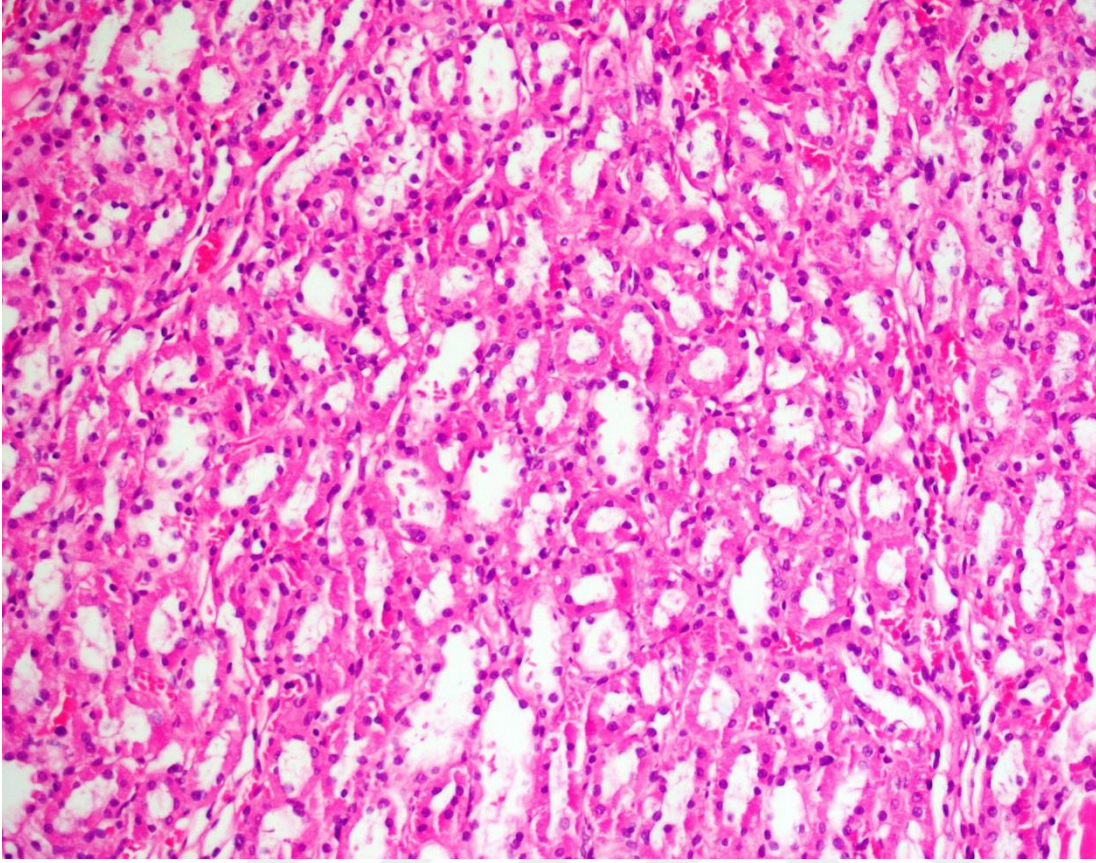


Resim 8: Vorinostat+Sisplatin grubu. Hafif tübüler dilatasyon, tübül epitellerinde hafif hidropik dejenerasyon, hafif eozinofilik dejenerasyon (H&E, 20x10)

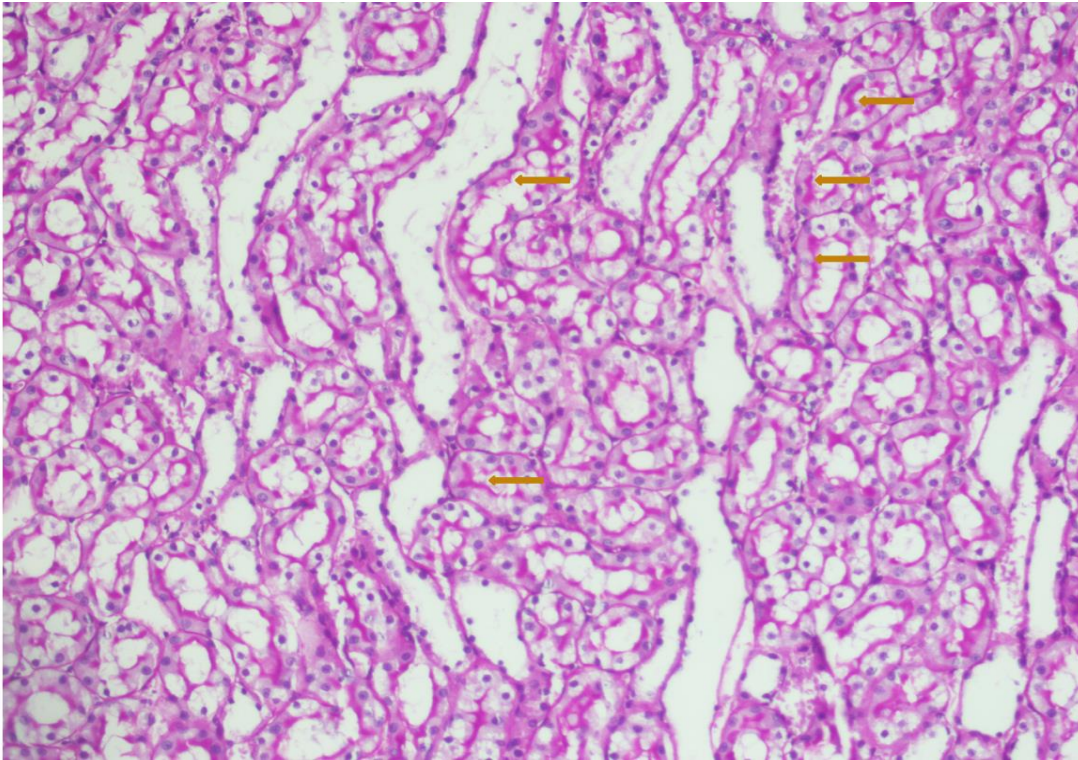


Resim 9: Vorinostat+Sisplatin grubu. Fokal tübüler cast formasyonu, tübüler organizasyon ve tübül epitelyum hücreleri (PAS, 20x10)

Vorinostat grubu: Bu grupta yapılan incelemede tübüler epitel hücrelerinin ve tübüler formasyonun korunduğu, vorinostatın böbrek dokusunda herhangi bir değişiklik yapmadığı görüldü (Resim 10 ve 11).



Resim 10: Vorinostat grubu. Korunmuş tübüler organizasyon (H&E, 20x10)



Resim 11: Vorinostat grubu. Korunmuş tübül epitel hücreleri (PAS, 20x10)

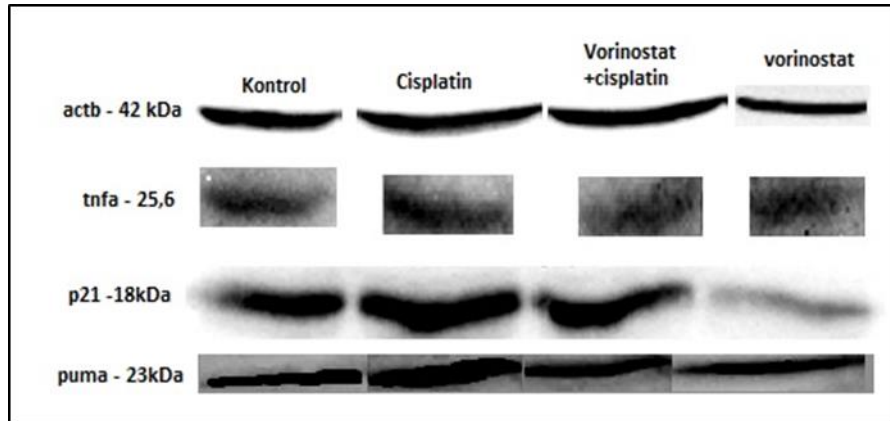
5.4. Western-Blot analizleri

Doku TNF-alfa, p21 ve PUMA-alfa protein ekspresyon düzeyleri

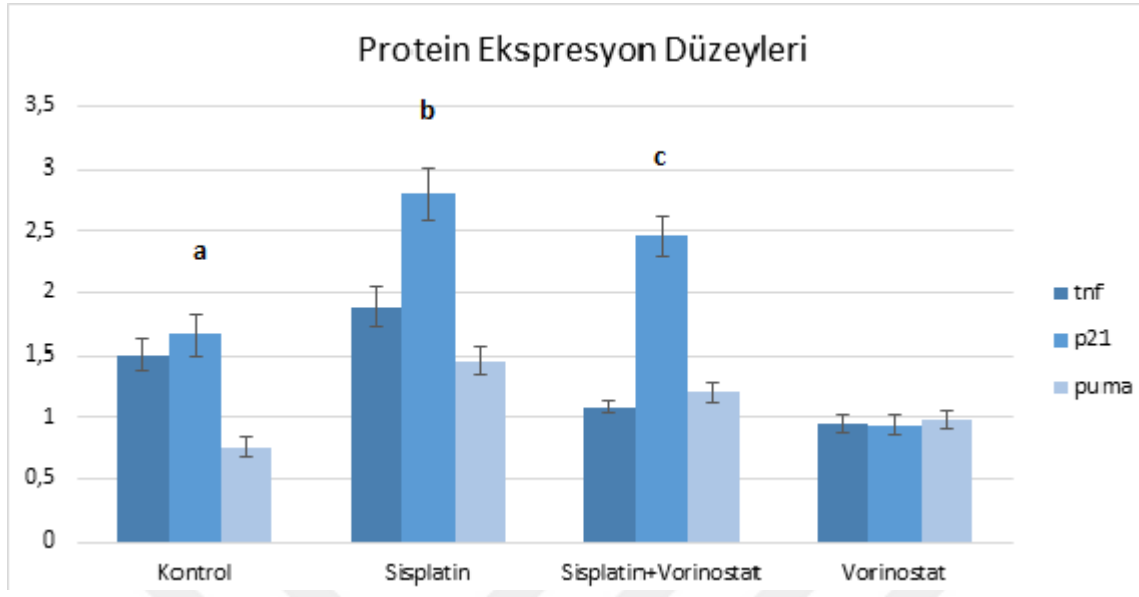
Doku TNF-alfa protein ekspresyon düzeyleri incelendiğinde; Sisplatin grubunda TNF-alfa protein ekspresyonunun Kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı şekilde arttığı ($p<0,05$), Vorinostat+Sisplatin grubunda ise TNF-alfa protein ekspresyonunun, Sisplatin grubuna kıyasla anlamlı olarak azaldığı görülmüştür ($p<0,05$) (Şekil 10).

Doku p21 protein ekspresyon düzeyleri incelendiğinde; Sisplatin grubunda p21 protein ekspresyonunun Kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde arttığı ($p<0,05$), Vorinostat+Sisplatin grubunda ise p21 protein ekspresyonunun, Sisplatin grubuna kıyasla anlamlı olarak azaldığı görülmüştür ($p<0,05$) (Şekil 10).

Doku PUMA-alfa protein ekspresyon düzeyleri incelendiğinde; Sisplatin grubunda PUMA-alfa protein ekspresyonunun Kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı şekilde arttığı ($p<0,05$), Vorinostat+Sisplatin grubunda ise TNF-alfa protein ekspresyonunun, Sisplatin grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azaldığı görülmüştür ($p<0,05$) (Şekil 10).



Şekil 9. Actb, TNF-alfa , p21 ve PUMA-alfa proteinlerine ait western-blot bant görüntüsü



Şekil 10. Gruplara göre doku protein ekspresyon düzeyleri (%) (n=8) (a-b $p < 0.05$, b-c $p < 0.05$)

6. TARTIŞMA

Antineoplastik ilaçlar, kontrolsüzce çoğalan kanser hücrelerini yok ederken, vücudun hızlı çoğalan normal hücrelerine de zarar verirler. Bu nedenle çoğu kanser ilacı, kemik iliği hücreleri ve gastrointestinal sistem epitel hücreleri gibi hızlı çoğalan hücrelere sahip dokularda yan etki ortaya çıkarır (130). Bunun yanında hızlı çoğalan hücrelere sahip olmasa da böbrekler de kardiyak outputun %25'ini karşılaması, toksinleri emilim ve sekresyon aşamalarında konsantre etmeleri, transport proteinlerinin intraselüler toksin konsantrasyonunu artırması, geniş lümen yüzey alanı ve geniş biyotransformasyon kapasitesinden (4) dolayı antineoplastik ilaçların hedefinde yer almaktadır.

Sisplatinin kullanıldığı kemoterapi protokollerinin en önemli yan etkilerinden birisi nefrotoksisitedir ve bu durum oksidatif stres, DNA etkileşimi, inflamasyon, mitokondriyal disfonksiyon, tübül epitel hücrelerine direkt toksik etki (3) gibi altta yatan mekanizmalarla klinikte akut böbrek hasarı olarak karşımıza çıkmaktadır.

Vorinostat, HDAC enziminin in vivo ve in vitro geri gönüslü inhibitörüdür (123) ve asetile edilmiş H3 ve H4 histonlarının akümüleyonunu artırarak direkt olarak kromatinin ve dolayısıyla nükleozomun gen düzenleyici faktörlerle olan ilişkisini düzenler (124). Bu ilaç kutanöz T hücreli lenfoma tedavisinde kullanılmakta ve etkisini histon asetilasyonunu artırarak gösterdiği için başka birçok hastalığın tedavisi için de denenmektedir. Bu nedenle literatürde vorinostat ile ilgili yapılmış birçok bilimsel araştırma mevcuttur. Örneğin, ratlarda yapılan diyabetik nefropati modeli bir çalışmada kullanılan vorinostatın, kardiyomiyositlerdeki ATP içeriğini, metabolik aktiviteyi ve reaktif oksijen radikali seviyesini olumlu yönde değiştirerek diyabete bağlı gelişen kardiyomiyosit kontraktıl disfonksiyonu iyileştirdiği gösterilmiştir (18).

Histon deasetilaz inhibitörleri, kemoterapötik ajanlar olarak geliştirilmişlerdir. Yüksek konsantrasyonlarda böbrek epitel hücrelerinde apoptozu indükledikleri bildirilmiştir (6). Ancak düşük dozlarda sisplatinin neden olduğu apoptoza karşı koruyucu oldukları in vitro olarak gösterilmiştir (131). Yapılan bir çalışmada p21'in

sisplatinin neden olduğu akut böbrek hasarını önlediği gösterilmiştir (132). PUMA-alfa'nın da siplatin verilen hücre gruplarında p53 artışı ile paralel olarak arttığı gösterilmiştir (70). p53'ün transkripsiyon regülasyonundaki iki hedefi olan PUMA-alfa (p53 upregulated modulator of apoptosis alfa) ve PIDD (p53 induced protein with a death domain), siplatin nedenli hücre ölümünde p53 aktivitesini düzenlerler. PUMA-alfa ise siplatin tarafından p53 bağımlı olarak indüklenen bir proapoptotik proteindir (70). Çalışmamızda Western-Blot analizi ile siplatinin tek başına PUMA-alfa'yı artırdığını, siplatin ile birlikte verilen vorinostatın ise PUMA-alfa'yı azalttığını kaydettik.

Vorinostatın antitümöral özelliği ilk olarak CWR22 insan prostat tümör hücrelerinin farelere nakledilmesi ile gösterilmiştir. Vorinostatın kontrollü ve intraperitoneal (i.p.) olarak 50 mg/kg/gün dozunda uygulanması sonucu tümör hacminde ortalama %97 oranında bir azalma gözlenirken herhangi bir toksisite saptanmamıştır(123). Dong ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada; renal proksimal tübül hücre kültüründe siplatinin neden olduğu apoptozun vorinostat tedavisi ile nasıl değiştğine bakılmış. 5µM vorinostat ön tedavisi için hücreler 1x10⁶ 35 mm hücre kabına bir gün sonrasında 5µM son vorinostat dozuna yetiştcek şekilde yerleştirilmiş. Son dozdan 6 saat sonra 20µM siplatin ile 1 µM vorinostat varlığında hücreler inkübe edilmiş. Bu çalışmanın sonuçlarına göre; siplatin %53 oranında apoptoza neden olurken, vorinostat bu oranı %21'e düşürmüştür. Vorinostatın uzun dönem etkilerini görmek için siplatin verilışinden 48 saat sonra hücre parametreleri incelenmiştir. Bu çalışmaya göre vorinostatın renal hücre koruyucu etkisinin sadece doza bağılı değil doz ile birlikte vorinostatın ne kadar süre ile verildiğine de bağılı olduğu bildirilmiştir (133). Bizim çalışmamızda da siplatin verilen grupta p21'in anlamlı derecede arttığı, siplatin ile beraber vorinostat verdiğimiz grupta ise p21'in anlamlı derecede azaldığı, sadece siplatin verilen grupta artan PUMA-alfa'nın da siplatin+vorinostat gurubunda anlamlı derecede azaldığı tespit edildi. Bu da vorinostatın siplatinin neden olduğu apoptozu azalttığı yönünde bir gösterge olarak kabul edildi. Ayrıca p21'in siplatin verilmesiyle beraber artmasını, ortaya çıkan apoptozu baskılamak için organizmanın doğal bir yanıtı olduğunu ve vorinostat verilmesiyle birlikte p21 ekspresyonunun azalmasını ise vorinostatın siplatin

nefrotoksisitesine karşı koruyucu olduğunun rölatif bir göstergesi olarak kabul ettik (66).

Yapılan bir çalışmada tek başına sisplatin verilen grupta renal glutatyon seviyelerinde anlamlı bir düşüş, üre, kreatinin, MDA, TNF-alfa, p53 ve nükleer faktör kappa B seviyelerinde belirgin artış görülmüş, sisplatin ile birlikte düşük doz vorinostat verilen grupta ise yukarıdaki tüm parametrelerin olumlu yönde değiştiği gözlenmiştir (134). Aynı çalışma üzerinden sisplatin hepatotoksisitesi üzerine vorinostatın koruyucu etkilerinin yapıldığı çalışmada (135) ise hepatik hasarın göstergelerinden biri olarak kabul edilen MDA'nın sisplatin verilen grupta anlamlı olarak arttığı ve sisplatin ile birlikte vorinostat verilen grupta anlamlı olarak azaldığı görülmüştür. Butler ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada; 25 ya da 50 mg/kg vorinostatın H3 ve H4 total asetilasyonunu artırdığı görülmüştür (123). Bizim çalışmamızda da 50 mg/kg vorinostat kullanıldı ve yukarıda aktarılan verilere benzer biçimde; sisplatin verilen grupta üre, kreatinin, MDA, TNF-alfa değerlerinde belirgin bir yükselme; sisplatin ile birlikte vorinostat verilen grupta ise tüm bu değerlerde istatistiksel olarak anlamlı azalma kaydedildi. Farelerde glioksalatın oluşturduğu böbrek hasarına karşı vorinostatın kullanıldığı bir çalışmada vorinostat verilen grupta MDA seviyelerinin azaldığı ve apoptozun daha az meydana geldiği tespit edilerek vorinostatın glioksalatın fare böbreğinde oluşturduğu hasarı azalttığı ortaya konmuştur (136). Bizim çalışmamızda da vorinostat+sisplatin grubunda MDA seviyelerinin sisplatin grubuna göre anlamlı olarak azaldığını gösterdik.

TNF-alfa, birçok enfeksiyöz ve inflamatuvar hastalıkta başrolde olan prototipik bir inflamatuvar sitokindir. Anti-TNF tedavileri; psöriyazis, romatoid artrit ve inflamatuvar barsak hastalıkları gibi belirgin inflamatuvar hastalıklarda yaygın olarak kullanılır. Deng ve arkadaşlarının (78) ve Kelly ve arkadaşlarının (77) yaptığı fare çalışmalarında, sisplatin nefrotoksisitesinde TNF-alfa'nın renal ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir. Başka bir çalışmada ise vorinostatın insan PBMC (periferik insan mononükleer hücreleri)'de lipopolisakkarit (antijen) nedenli TNF-alfa, IL-1beta, IL-12 ve IFN-gama'yı inhibe ettiği gösterilmiştir (125,126). Bu çalışmaya göre; vorinostatın in vitro olarak mezengiyal hücrenin inflamatuvar medyatör üretimini bloke ettiği görülmüştür. Çalışmamızda Western-Blot yöntemi ile elde

ettiğimiz verilere göre sisplatin ile rat böbrek dokusunda TNF-alfa'nın anlamlı derece arttığını ve vorinostat verildikten sonra TNF-alfa'nın anlamlı derecede azaldığını tespit ettik.

Çalışmamızda elde ettiğimiz histopatolojik verilere göre rat böbrek dokularında kontrol grubu ile karşılaştırıldığında; sisplatin grubunda tübül epitellerinde nükleus kaybı şeklinde prenekrotik değişiklikler ve fırçamsı kenar kaybı, sisplatin+vorinostat grubunda hafif tübüler dilatasyon, tübül epitellerinde hafif hidropik dejenerasyon, hafif eozinofilik dejenerasyon ve fokal tübüler cast formasyonu, vorinostat grubunda ise tübüler yapıların korunduğu görülmüştür. Yapılan benzer bir çalışmada sisplatin verilen sıçanlardaki patolojik hasar, tübüllerde ortaya çıkmış ve tübüler atrofi, epitel deskuamasyonu, debris, tübüler lümende nekrotik materyal ve interstisyel dokuda lenfosit yoğunluğu ile kendini göstermiş ve üre ve kreatinin yüksekliğinin de patolojik hasarla korelasyon gösterdiği görülmüştür (137). Bizim çalışmamızda da sisplatinin ortaya çıkardığı patolojik hasarla beraber üre ve kreatinin yüksekliği birliktelik göstermiş ve sisplatin ile beraber vorinostat verildiğinde patolojik hasarla beraber üre ve kreatinin de azalmıştır.

Nefrotoksisiteye bağlı olarak ortaya çıkan vasküler hasar sonucu izole perfüze böbrekte daha önce yapılan çalışmalarda renal kan akımının bozulduğu, perfüzyon basıncının buna bağlı olarak yükseldiği bildirilmiştir (138,139). Sisplatin nefrotoksisitesi üzerine vorinostatın etkilerinin araştırıldığı önceki çalışmalarda, izole perfüze böbreklerde renal basınç değişimleri incelenmemiştir. Yaptığımız çalışmada Langendorff düzeneği kullanılarak izole perfüze böbreklerin renal perfüzyon basınçları ölçüldü; böbrek basınçlarının sisplatin verilen grupta, kontrol grubuna göre arttığı ve sisplatin ile birlikte vorinostat verilen grupta anlamlı olarak azaldığı görüldü. Bu da sisplatinin böbrekte oluşturduğu hasara bağlı olarak vasküler direnci artırdığını, vorinostatın ise koruyucu etkisi ile oluşan direnci azalttığını göstermektedir.

Sonuç olarak vorinostatın kemoterapi tedavisi alan kanser hastalarında sisplatinin neden olduğu nefrotoksisiteye karşı koruyucu etkileri olduğu görüldü.

7.SONUÇ VE ÖNERİLER

Yaptığımız bu çalışmada, sisplatine bağlı ortaya çıkan nefrotoksisitede lipid peroksidasyonu, inflamasyon ve apoptozis gibi mekanizmaların rolü olduğu ve bunlara bağlı olarak ortaya çıkan patolojik değişimlerin vorinostatın etkisiyle hafifletilerek nefrotoksisitenin azaltılabileceği anlaşılmıştır. Sisplatinin nefrotoksik etkisini önlemeye yönelik, olası mekanizmaları ortaya koyacak ve aydınlatacak ileri çalışmalar sisplatinin klinik kullanımına katkı sağlayacaktır.



8.KAYNAKLAR

- 1- Lillie M.A. Barnett and Brian S. Cummings. Nephrotoxicity and Renal Pathophysiology: A Contemporary Perspective. Toxicological Sciences, 164(2), 2018, 379–390
- 2- Sastry J and Kellie SJ: Severe neurotoxicity, ototoxicity and nephrotoxicity following high-dose cisplatin and amifostine. Pediatric hematology and oncology 22:441-5, 2005
- 3- Yao X, Panichpisal K, Kurtzman N and Nugent K: Cisplatin nephrotoxicity: a review. The American journal of the medical sciences 334:115-24, 2007
- 4- Pathophysiology of nephrotoxic acute renal failure Rick G. Schnellmann, Katrina J. Kelly
- 5- Lindemann KR, Johnstone WR. Histone deacetylase inhibitors: promising candidates for chemotherapeutic drugs. Gene Ther Mol Biol 2004;8:61-74.
- 6- Dong, G.; Wang, L.; Wang, C.-Y.; Yang, T.; Kumar, M.V.; Dong, Z. Induction of apoptosis in renal tubular cells by histone deacetylase inhibitors, a family of anticancer agents. J. Pharmacol. Exp. Ther. 2008, 325, 978–984.
- 7- Narlikar GJ, Fan HY, Kingston RE. Cooperation between complexes that regulate chromatin structure and transcription. Cell 2002;108(4):475-87.
- 8- Rosato RR, Grant S. Histone deacetylase inhibitors: insights into mechanisms of lethality. Expert Opin Ther Targets 2005;9(4):809-24.
- 9- Hrzanjak A, Moinfar F, Kremser ML, Strohmeier B, Staber PB, Zatloukal K, et al. Valproate inhibition of histone deacetylase 2 affects differentiation and decreases proliferation of endometrial stromal sarcoma cells. Mol Cancer Ther 2006;5(9):2203-10.
- 10- Butler LM, Zhou X, Xu WS, Scher HI, Rifkind RA, Marks PA, et al. The histone deacetylase inhibitor SAHA arrests cancer cell growth, up-regulates thioredoxin-binding protein-2, and down-regulates thioredoxin. Proc Natl Acad Sci USA 2002;99(18):11700-5.
- 11- Lager G, Doetzlhofer A, Schuettengruber B, Haidweger E, Simboeck E, Tischler J, et al. The tumor suppressor p53 and histone deacetylase 1 are antagonistic regulators of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21/WAF1/CIP1 gene. Mol Cell Biol 2003;23(8):2669-79.

- 12- Taddei A, Roche D, Bickmore WA, Almouzni G. The effects of histone deacetylase inhibitors on heterochromatin: implications for anticancer therapy? *EMBO Rep* 2005;6(6):520-4.
- 13- Bernhard D, Ausserlechner MJ, Tonko M, Löffler M, Hartmann BL, Csordas A, et al. Apoptosis induced by the histone deacetylase inhibitor sodium butyrate in human leukemic lymphoblasts. *FASEB J* 1999;13(14):1991-2001.
- 14- Barneda-Zahonero B, Parra M. Histone deacetylases and cancer. *Mol Oncol* 2012;6(6):579-89.
- 15- Taddei A, Roche D, Bickmore WA, Almouzni G. The effects of histone deacetylase inhibitors on heterochromatin: implications for anticancer therapy. *EMBO Rep* 2005;6(6):520-4.
- 16- Richon VM, Garcia-Vargas J, Hardwick JS. Development of vorinostat: current applications and future perspectives for cancer therapy. *Cancer Lett* 2009;280(2):201-10.
- 17- Surabhi Shukla, Zia Shariat-Madar, Larry A. Walker, Babu L. Tekwani . Mechanism for neurotropic action of vorinostat, a pan histone deacetylase inhibitor. *Mol Cell Neurosci.* 2016 Dec;77:11-20. doi: 10.1016/j.mcn.2016.09.003. Epub 2016 Sep 24.
- 18- Leonardo Bocchi, Benedetta M. Motta, Monia Savi , Rocchina Vilella, Viviana Meraviglia, Federica Rizzi, Serena Galati , Annamaria Buschini , Mirca Lazzaretti , Peter P. Pramstaller, Alessandra Rossini and Donatella Stilli. The Histone Deacetylase Inhibitor Suberoylanilide Hydroxamic Acid (SAHA) Restores Cardiomyocyte Contractility in a Rat Model of Early Diabetes. *Int. J. Mol. Sci.* 2019, 20, 1873
- 19- Rink-Jan Lohman, Abishek Iyer, Thomas J Fairlie, Adam Cotterell, Praveer Gupta, Robert C Reid, David A Vesey, Matthew J Sweet, David P Fairlie. Differential anti-inflammatory activity of HDAC
- 20- Dong, G., Luo, J., Kumar, V. & Dong, Z. Inhibitors of histone deacetylases suppress cisplatin-induced p53 activation and apoptosis in renal tubular cells. *Am. J. Physiol. Ren. Physiol.* 298, F293–F300 (2010).
- 21- Crona DJ, Faso A, Nishijima TF, McGraw KA, Galsky MD, Milowsky MI. A systematic review of strategies to prevent cisplatin-induced nephrotoxicity. *Oncologist.* 2017;22(5):609–19. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.2016-0319>.
- 22- Kemp G, Rose P, Lurain J, Berman M, Manetta A, Rouillet B, et al. Amifostine pretreatment for protection against cyclophosphamide-induced

and cisplatin-induced toxicities: results of a randomized control trial in patients with advanced ovarian cancer. *J Clin Oncol*. 1996;14(7):2101–12.

23- Hausheer FH, Kanter P, Cao S, Haridas K, Seetharamulu P, Reddy D, et al. Modulation of platinum-induced toxicities and therapeutic index: mechanistic insights and first and second-generation protecting agents. *Semin Oncol*. 1998;25(5):584–99.

24- Gi-Su Oh, Ph.D., Hyung-Jin Kim, Ph.D., AiHua Shen, M.S., Su Bin Lee, B.S., Dipendra Khadka, B.S., Arpana Pandit, B.S. and Hong-Seob So, PhD. Cisplatin-induced Kidney Dysfunction and Perspectives on Improving Treatment Strategies. *Electrolyte Blood Press* 12:55-65, 2014 <http://dx.doi.org/10.5049/EBP.2014.12.2.55>

25- Neife Aparecida Guinaim dos Santos, Maria Augusta Carvalho Rodrigues, Nadia Maria Martins, Antonio Cardozo dos Santos. Cisplatin-induced nephrotoxicity and targets of nephroprotection: an update, *Arch Toxicol* (2012) 86:1233–1250 DOI 10.1007/s00204-012-0821-7

26- L, T. *Cancer Drug Resistance Research Perspectives*. New York: Nova Science Publishers, Inc. (2007).

27- Moxley KM, McMeekin DS. Endometrial carcinoma: a review OF chemotherapy, drug resistance, and the search for new agents. *Oncologist*. 2010;15(10):1026–33. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.2010-0087>.

28- KW L, Kim JH, Yun T, Song EK, Na II, Shin H, et al. Phase II study of low-dose paclitaxel and cisplatin as a second-line therapy after 5-fluorouracil/platinum chemotherapy in gastric cancer. *J Korean Med Sci*. 2007;22(Suppl):S115–21. <https://doi.org/10.3346/jkms.2007.22.S.S115>.

29- Dasari S, Tchounwou PB. Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. *Eur J Pharmacol*. 2014;0:364–78.

30- Oğuz KAYAALP. Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji. 32. Baskı syf. 332 (2009)

31- Miller RP, Tadagavadi RK, Ramesh G, Reeves WB. Mechanisms of cisplatin nephrotoxicity. *Toxins (Basel)*. 2010;2(11):2490–2518. <https://doi.org/10.3390/toxins2112490>

32- Hausheer FH, Parker AR, Petluru PN, Jair KW, Chen S, Huang Q, et al. Mechanistic study of BNP7787-mediated cisplatin nephroprotection: modulation of human aminopeptidase N. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2011;67(2):381–91. <https://doi.org/10.1007/s00280-010-1333-x>.

33- Pabla N, Dong Z. Cisplatin nephrotoxicity: mechanisms and renoprotective strategies. *Kidney Int*. 2008;73(9):994–1007. <https://doi.org/10.1038/sj.ki.5002786>.

- 34- Fliedl L, Wieser M, Manhart G, Gerstl MP, Khan A, Grillari J, et al. Controversial role of gamma-glutamyl transferase activity in cisplatin nephrotoxicity. *ALTEX*. 2014;31(3):269–78. doi: <https://doi.org/10.14573/altex.1311152>
- 35- Bolisetty S, Traylor A, Joseph R, Zarjou A, Agarwal A. Proximal tubule-targeted heme oxygenase-1 in cisplatin-induced acute kidney injury. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2016;310(5):F385–94. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00335.2015>.
- 36- Ciarimboli G. Membrane transporters as mediators of cisplatin side effects. *Anticancer Res*. 2014;34(1):547–50.
- 37- Saito Y, Okamoto K, Kobayashi M, Narumi K, Furugen A, Yamada T, et al. Magnesium co-administration decreases cisplatin-induced nephrotoxicity in the multiple cisplatin administration. *Life Sci*. 2017;189:18–22. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2017.08.028>.
- 38- Nematbakhsh M, Ebrahimian S, Tooyserkani M, Eshraghi-Jazi F, Talebi A, Ashrafi F. Gender difference in cisplatin-induced nephrotoxicity in a rat model: greater intensity of damage in male than female. *Nephrourol Mon*. 2013;5(3):818–21. <https://doi.org/10.5812/numonthly.10128>.
- 39- Muraki K, Koyama R, Honma Y, Yagishita S, Shukuya T, Ohashi R, et al. Hydration with magnesium and mannitol without furosemide prevents the nephrotoxicity induced by cisplatin and pemetrexed in patients with advanced non-small cell lung cancer. *J Thorac Dis*. 2012;4(6):562–8. <https://doi.org/10.3978/j.issn.2072-1439.2012.10.16>.
- 40- Townsend, D.M.; Deng, M.; Zhang, L.; Lapus, M.G.; Hanigan, M.H. Metabolism of Cisplatin to a nephrotoxin in proximal tubule cells. *J. Am. Soc. Nephrol*. 2003, 14, 1–10.
- 41- Cecka JM, Cho YW, Terasaki PI. Analysis of the UNOS scientific renal transplant registry at 3 years. Early events affecting transplant success. *Transplantation* 1992; 53: 59–64
- 42- Kuhlmann MK, Burkhardt G and Köhler H. Insights into potential cellular mechanisms of cisplatin nephrotoxicity and their clinical application. *Nephrol Dial Transplant* (1997) 12: 2478–2480
- 43- Pascoe, J.M.; Roberts, J.J. Interactions between mammalian cell DNA and inorganic platinum compounds. I. DNA interstrand cross-linking and cytotoxic properties of platinum(II) compounds. *Biochem. Pharmacol*. 1974, 23, 1359–1365.
- 44- Wang, D.; Lippard, S.J. Cellular processing of platinum anticancer drugs. *Nat. Rev. Drug Discov*. 2005, 4, 307–320.

- 45- Burger, H.; Nooter, K.; Boersma, A.W.M.; Kortland, C.J.; Stoter, G. Lack of correlation between cisplatin-induced apoptosis, p53 status and expression of Bcl-2 family proteins in testicular germ cell tumour cell lines. *Int. J. Cancer* 1997, 73, 592–599.
- 46- Mandic, A.; Hansson, J.; Linder, S.; Shoshan, M.C. Cisplatin induces endoplasmic reticulum stress and nucleus-independent apoptotic signaling. *J. Biol. Chem.* 2003, 278, 9100–9106.
- 47- Cullen, K.J.; Yang, Z.; Schumaker, L.; Guo, Z. Mitochondria as a critical target of the chemotherapeutic agent cisplatin in head and neck cancer. *J. Bioenerg. Biomembr.* 2007, 39, 43–50.
- 48- Qian, W.; Nishikawa, M.; Haque, A.M.; Hirose, M.; Mashimo, M.; Sato, E.; Inoue, M. Mitochondrial density determines the cellular sensitivity to cisplatin-induced cell death. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2005, 289, C1466–C1475.
- 49- Gullans, S.R.; Mandel, L.J. Coupling of energy transport in proximal and distal nephron. In *The Kidney: Physiology and Pathophysiology*, 3rd ed.; Seldin, D.W., Giebisch, G., Eds.; Lippincott Williams and Wilkins: Philadelphia, PA, USA, 2000; Volume 1, pp. 445–482.
- 50- Pabla N and Dong Z: Cisplatin nephrotoxicity: mechanisms and renoprotective strategies. *Kidney international* 73:994-1007, 2008
- 51- Ozkok A, Edelstein CL. Pathophysiology of cisplatin-induced acute kidney injury. *Biomed Res Int.* 2014;2014:967826. <https://doi.org/10.1155/2014/967826>.
- 52- Lee RH, Song JM, Park MY, Kang SK, Kim YK, Jung JS. Cisplatin-induced apoptosis by translocation of endogenous Bax in mouse collecting duct cells. *Biochem Pharmacol.* 2001;62(8):1013–23.
- 53- Kaushal GP, Kaushal V, Hong X, Shah SV. Role and regulation of activation of caspases in cisplatin-induced injury to renal tubular epithelial cells. *Kidney Int.* 2001;60(5):1726–36. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1755.2001.00026.x>.
- 54- Tsuruya, K.; Ninomiya, T.; Tokumoto, M.; Hirakawa, M.; Matsutani, K.; Taniguchi, M.; Fukuda, K.; Kanai, H.; Kishihara, K.; Hirakata, H.; Iida, M. Direct involvement of thereceptor-mediated apoptotic pathways in cisplatin-induced renal tubular cell death. *Kidney Int.* 2003, 63, 72–82.
- 55- Jiang, M.; Wang, C.-Y.; Huang, S.; Yang, T.; Dong, Z. Cisplatin-induced apoptosis in p53-deficient renal cells via the intrinsic mitochondrial pathway. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 2009, 296, F983–F993.

- 56- Yang, C.; Kaushal, V.; Haun, R.S.; Seth, R.; Shah, S.V.; Kaushal, G.P. Transcriptional activation of caspase-6 and -7 genes by cisplatin-induced p53 and its functional significance in cisplatin nephrotoxicity. *Cell Death Differ.* 2008, 15, 530–544.
- 57- Strasser A, O'Connor L and Dixit VM: Apoptosis signaling. *Annual review of biochemistry* 69:217-45, 2000
- 58- Seth R, Yang C, Kaushal V, Shah SV and Kaushal GP: p53-dependent caspase-2 activation in mitochondrial release of apoptosis-inducing factor and its role in renal tubular epithelial cell injury. *The Journal of biological chemistry* 280:31230-9, 2005
- 59- Takeda M, Kobayashi M, Shirato I, Osaki T and Endou H: Cisplatin-induced apoptosis of immortalized Mouse proximal tubule cells is mediated by interleukin-1 beta converting enzyme (ICE) family of proteases but inhibited by overexpression of Bcl-2. *Archives of toxicology* 71: 612-21, 1997
- 60- Lee, R.H.; Song, J.M.; Park, M.Y.; Kang, S.K.; Kim, Y.K.; Jung, J.S. Cisplatin-induced apoptosis by translocation of endogenous Bax in mouse collecting duct cells. *Biochem. Pharmacol.* 2001, 62, 1013–1023.
- 61- Cilenti, L.; Kyriazis, G.A.; Soundarapandian, M.M.; Stratico, V.; Yerkes, A.; Park, K.M.; Sheridan, A.M.; Alnemri, E.S.; Bonventre, J.V.; Zervos, A.S. Omi/HtrA2 protease mediates cisplatin-induced cell death in renal cells. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 2005, 288, F371–F379.
- 62- Dursun, B.; He, Z.; Somerset, H.; Oh, D.J.; Faubel, S.; Edelstein, C.L. Caspases and calpain are independent mediators of cisplatin-induced endothelial cell necrosis. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 2006, 291, F578–F587.
- 63- Liu, H.; Baliga, R. Endoplasmic reticulum stress-associated caspase 12 mediates cisplatin-induced LLC-PK1 cell apoptosis. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2005, 16, 1985–1992.
- 64- Peyrou, M.; Hanna, P.E.; Cribb, A.E. Cisplatin, gentamicin, and p-aminophenol induce markers of endoplasmic reticulum stress in the rat kidneys. *Toxicol. Sci.* 2007, 99, 346–353.
- 65- Price PM, Safirstein RL and Megyesi J: Protection of renal cells from cisplatin toxicity by cell cycle inhibitors. *American journal of physiology. Renal physiology* 286:F378-84, 2004
- 66- Price PM, Yu F, Kaldis P, Aleem E, Nowak G, Safirstein RL and Megyesi J: Dependence of cisplatin-induced cell death in vitro and in vivo on cyclin-dependent kinase 2. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN* 17:2434-42, 2006

- 67- Bassett EA, Wang W, Rastinejad F and El-Deiry WS: Structural and functional basis for therapeutic modulation of p53 signaling. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research* 14:6376-86, 2008
- 68- Wei Q, Dong G, Yang T, Megyesi J, Price PM and Dong Z: Activation and involvement of p53 in cisplatin-induced nephrotoxicity. *American journal of physiology. Renal physiology* 293:F1282-91, 2007
- 69- Molitoris BA, Dagher PC, Sandoval RM, Campos SB, Ashush H, Fridman E, Brafman A, Faerman A, Atkinson SJ, Thompson JD, Kalinski H, Skaliter R, Erlich S and Feinstein E: siRNA targeted to p53 attenuates ischemic and cisplatin-induced acute kidney injury. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN* 20:1754-64,2009
- 70- Jiang, M.; Wei, Q.; Wang, J.; Du, Q.; Yu, J.; Zhang, L.; Dong, Z. Regulation of PUMA- α by p53 in cisplatin-induced renal cell apoptosis. *Oncogene* 2006, 25, 4056–4066.
- 71- Seth, R.; Yang, C.; Kaushal, V.; Shah, S.V.; Kaushal, G.P. p53-dependent caspase-2 activation in mitochondrial release of apoptosis-inducing factor and its role in renal tubular epithelial cell injury. *J. Biol. Chem.* 2005, 280, 31230–31239.
- 72- Ronald P. Miller, Raghu K. Tadagavadi, Ganesan Ramesh and William Brian Reeves. Mechanisms of Cisplatin Nephrotoxicity A Review. *Toxins* 2010, 2, 2490-2518; doi: 10.3390/toxins2112490
- 73- Ramesh G, Reeves WB. TNF- α mediates chemokine and cytokine expression and renal injury in cisplatin nephrotoxicity. *J Clin Invest.* 2002;110(6):835–42.<https://doi.org/10.1172/JCI15606>.
- 74- Zhang B, Ramesh G, Norbury CC, Reeves WB. Cisplatin-induced nephrotoxicity is mediated by tumor necrosis factor- α produced by renal parenchymal cells. *Kidney Int.* 2007;72(1):37–44. <https://doi.org/10.1038/sj.ki.5002242>.
- 75- Summers SA, Chan J, Gan PY, Dewage L, Nozaki Y, Steinmetz OM, Nikolic-Paterson DJ, Kitching AR, Holdsworth SR. Mast cells mediate acute kidney injury through the production of TNF. *J Am Soc Nephrol* 201122(12):2226–2236.
- 76- Ramseyer VD, Garvin JL. Tumor necrosis factor- α : regulation of renal function and blood pressure. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2013;304(10):F1231–42.
- 77- Kelly KJ, Meehan SM, Colvin RB, Williams WW, Bonventre JV. Protection from toxicant-mediated renal injury in the rat with anti-CD54 antibody. *Kidney Int.* 1999;56(3):922–31. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1755.1999.00629.x>.

- 78- Deng, J.; Kohda, Y.; Chiao, H.; Wang, Y.; Hu, X.; Hewitt, S.; Miyajima, T.; McLeroy, P.; Nibhanupudy, B.; Li, S.; Star, R. Interleukin-10 inhibits ischemic and cisplatin-induced acute renal injury. *Kidney Int.* 2001, 60, 2118–2128.
- 79- Zhang, B.; Ramesh, G.; Norbury, C.; Reeves, W.B. Cisplatin-induced nephrotoxicity is mediated by tumor necrosis factor- α produced by renal parenchymal cells. *Kidney Int.* 2007, 72, 37–44.
- 80- Ramesh, G.; Reeves, W.B. Salicylate reduces cisplatin nephrotoxicity by inhibition of tumor necrosis factor- α . *Kidney Int.* 2004, 65, 490–498.
- 81- Laouar, Y.; Town, T.; Jeng, D.; Tran, E.; Wan, Y.; Kuchroo, V.K.; Flavell, R.A. TGF- β signaling in dendritic cells is a prerequisite for the control of autoimmune encephalomyelitis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2008, 105, 10865–10870.
- 82- Akbari, O.; DeKruyff, R.H.; Umetsu, D.T. Pulmonary dendritic cells producing IL-10 mediate tolerance induced by respiratory exposure to antigen. *Nat. Immunol.* 2001, 2, 725–731.
- 83- Soos, T.J.; Sims, T.N.; Barisoni, L.; Lin, K.; Littman, D.R.; Dustin, M.L.; Nelson, P.J. CX3CR1⁺ interstitial dendritic cells form a contiguous network throughout the entire kidney. *Kidney Int.* 2006, 70, 591–596.
- 84- Dong, X.; Swaminathan, S.; Bachman, L.A.; Croatt, A.J.; Nath, K.A.; Griffin, M.D. Resident dendritic cells are the predominant TNF-secreting cell in early renal ischemia-reperfusion injury. *Kidney Int.* 2007, 71, 619–628.
- 85- Kaushal, G.P.; Kaushal, V.; Herzog, C.; Yang, C. Autophagy delays apoptosis in renal tubular epithelial cells in cisplatin cytotoxicity. *Autophagy* 2008, 4, 710–712.
- 86- Periyasamy-Thandavan, S.; Jiang, M.; Wei, Q.; Smith, R.; Yin, X.M.; Dong, Z. Autophagy is cytoprotective during cisplatin injury of renal proximal tubular cells. *Kidney Int.* 2008, 74, 631–640.
- 87- Mercan U. Toksikolojide serbest radikallerin önemi. *YYU Vet Fak Derg.* 2004, 15(1-2);91-96.
- 88- Cornelison TL and Reed E: Nephrotoxicity and hydration management for cisplatin, carboplatin, and ormaplatin. *Gynecologic oncology* 50:147-58, 1993
- 89- Hanigan MH, Deng M, Zhang L, Taylor PT, Jr. And Lapus MG: Stress response inhibits the nephrotoxicity of cisplatin. *American journal of physiology. Renal physiology* 288:F125-32, 2005

- 90- Cooper GM, Hausman RE. The Cell: A Molecular Approach. 3rd ed. Washington DC, USA: ASM Press;2004. p.150-4.
- 91- Turner BM. Cellular memory and the histone code. Cell 2002;111(3):285-91.
- 92- Kaan KÜÇÜKOĞLU. Histonların Asetilasyonu ve Histon Deasetilaz İnhibitörleri DERLEME. Türkiye Klinikleri J Pharm Sci 2013;2(2):55-73
- 93- Wu J, Grunstein M. 25 years after the nucleosome model: chromatin modifications. Trends Biochem Sci 2000;25(12):619-23.
- 94- Bártová E, Krejčí J, Harnicarová A, Galiová G, Kozubek S. Histone modifications and nuclear architecture: a review. J Histochem Cytochem 2008;56(8):711-21.
- 95- Kouzarides T. Chromatin modifications and their function. Cell 2007; 128(4):693-705.
- 96- Brownell JE, Zhou J, Ranalli T, Kobayashi R, Edmondson DG, Roth SY, Allis CD. Tetrahymena histone acetyltransferase A: a homolog to yeast Gcn5p linking histone acetylation to gene activation. Cell. 1996;84:843–851. [PubMed] [Google Scholar] Strahl BD, Allis CD. The language of covalent histone modifications. Nature 2000;403(6765): 41-5.
- 97- Taunton J, Hassig CA, Schreiber SL. A mammalian histone deacetylase related to the yeast transcriptional regulator Rpd3p. Science. 1996;272:408–411. [PubMed] [Google Scholar] Bártová E, Krejčí J, Harnicarová A, Galiová G, Kozubek S. Histone modifications and nuclear architecture: a review. J Histochem Cytochem 2008;56(8):711-21.
- 98- Glozak MA, Sengupta N, Zhang X, Seto E. Acetylation and deacetylation of non-histone proteins. Gene. 2005;363:15–23. [PubMed] [Google Scholar]
- 99- Grant PA. A tale of histone modifications. Genome Biol 2001; 2(4):REVIEWS0003.
- 99- Nebbioso A, Clarke N, Voltz E, Germain E, Ambrosino C, Bontempo P, et al. Tumor-selective action of HDAC inhibitors involves TRAIL induction in acute myeloid leukemia cells. Nat Med 2005;11(1):77-84.
- 100- Koike M, Shimokawa H, Kanno Z, Ohya K, Soma K. Effects of mechanical strain on proliferation and differentiation of bone marrow stroma cell line ST2. J Bone Miner Metab 2005;23(3):219-25.
- 101- Fenrick R, Hiebert SW. Role of histone deacetylases in acute leukemia. J Cell Biochem Suppl 1998;30-31:194-202.

- 102- Krämer OH, Göttlicher M, Heinzl T. Histone deacetylase as a therapeutic target. *Trends Endocrinol Metab* 2001;12(7):294-300.
- 103- Liu S, Bishop WR, Liu M. Differential effects of cell cycle regulatory protein p21(WAF1/Cip1) on apoptosis and sensitivity to cancer chemotherapy. *Drug Resist Updat* 2003;6(4):183-95.
- 104- Marks PA, Miller T, Richon VM. Histone deacetylases. *Curr Opin Pharmacol* 2003;3(4):344-51.
- 105- Mathew OP, Ranganna K, Yatsu FM. Butyrate, an HDAC inhibitor, stimulates interplay between different posttranslational modifications of histone H3 and differently alters G1-specific cell cycle proteins in vascular smooth muscle cells. *Biomed Pharmacother* 2010;64(10):733-40.
- 106- Koprinarova M, Botev P, Russev G. Histone deacetylase inhibitor sodium butyrate enhances cellular radiosensitivity by inhibiting both DNA nonhomologous end joining and homologous recombination. *DNA Repair (Amst)* 2011;10(9):970-7
- 107- Theocharisa S, Margeli A, Kouraklis G. Peroxisome proliferator activated receptor-gamma ligands as potent antineoplastic agents. *Curr Med Chem Anticancer Agents* 2003;3(3):239-51.
- 108- Villar-Garea A, Esteller M. Histone deacetylase inhibitors: understanding a new wave of anticancer agents. *Int J Cancer* 2004;112(2):171-8.
- 109- Kelly WK, O'Connor OA, Marks PA. Histone deacetylase inhibitors: from target to clinical trials. *Expert Opin Investig Drugs* 2002;11(12):1695-713.
- 110- Vannini A, Volpari C, Filocamo G, Casavola EC, Brunetti M, Renzoni D, et al. Crystal structure of a eukaryotic zinc-dependent histone deacetylase, human HDAC8, complexed with a hydroxamic acid inhibitor. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101(42):15064-9.
- 111- Frew AJ, Johnstone RW, Bolden JE. Enhancing the apoptotic and therapeutic effects of HDAC inhibitors. *Cancer Lett* 2009;280(2):125-33.
- 112- Aditya Kumar Bubna. Vorinostat—An Overview. *Indian J Dermatol*. 2015 Jul-Aug; 60(4): 419
- 113- Hess-Stumpp H, Bracker TU, Henderson D, Politz O. MS-275, a potent orally available inhibitor of histone deacetylases--the development of an anticancer agent. *Int J Biochem Cell Biol* 2007;39(7-8):1388-405.

- 114- Dos Santos, N. A., Carvalho Rodrigues, M. A., Martins, N. M. & dos Santos, A. C. Cisplatin-induced nephrotoxicity and targets of nephroprotection: an update. *Arch. Toxicol.* 86, 1233–1250 (2012).
- 115- Yan, M., Tang, C., Ma, Z., Huang, S. & Dong, Z. DNA damage response in nephrotoxic and ischemic kidney injury. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 313, 104–108 (2016).
- 116- Zhu, S., Pabla, N., Tang, C., He, L. & Dong, Z. DNA damage response in cisplatin induced nephrotoxicity. *Arch. Toxicol.* 89, 2197–2205 (2015).
- 117- Ohsumi, Y. Historical landmarks of autophagy research. *Cell Res.* 24, 9–23 (2014).
- 118- Yang, Z. & Klionsky, D. J. Eaten alive: a history of macroautophagy. *Nat. Cell Biol.* 12, 814–822 (2010).
- 119- Havasi, A. & Dong, Z. Autophagy and tubular cell death in the kidney. *Semin. Nephrol.* 36, 174–188 (2016).
- 120- Jing Liu, Man J. Livingston, Guie Dong, Chengyuan Tang, Yunchao Su, Guangyu Wu, Xiao-Ming Yin and Zheng Dong. Histone deacetylase inhibitors protect against cisplatin-induced acute kidney injury by activating autophagy in proximal tubular cells. *Liu et al. Cell Death and Disease* (2018) 9:322 DOI 10.1038/s41419-018-0374-7
- 121- Patschan, D., Schwarze, K., Henze, E., Patschan, S. & Muller, G. A. Endothelial autophagy and endothelial-to-mesenchymal transition (EndoMT) in eEPC treatment of ischemic AKI. *J. Nephrol.* 29, 637–644 (2016).
- 122- Kim, M. S. et al. Inhibition of histone deacetylase increases cytotoxicity to anticancer drugs targeting DNA. *Cancer Res.* 63, 7291–7300 (2003).
- 123- Butler, L. M., D. B. Agus, H. I. Scher, B. Higgins, A. Rose, C. Cordon-Cardo, H. T. Thaler, R. A. Rifkind, P. A. Marks, and V. M. Richon. Suberoylanilide hydroxamic acid, an inhibitor of histone deacetylase, suppresses the growth of prostate cancer cells in vitro and in vivo. *Cancer Res* 2000;60(18):5165-70.
- 124- Turner, B. M. 1993. Decoding the nucleosome. *Cell* 75:5.
- 125- Kashem, A., M. Endoh, N. Yano, F. Yamauchi, Y. Nomoto, and H. Sakai. 1996. Expression of inducible-NOS in human glomerulonephritis: the possible source is infiltrating monocytes/macrophages. *Kidney Int.* 50:392.

- 126- Cook, H. T., J. Smith, J. A. Salmon, and V. Cattell. 1989. Functional characteristics of macrophages in glomerulonephritis in the rat: O₂ generation, MHC class II expression, and eicosanoid synthesis. *Am. J. Pathol.* 134:431.
- 127- European Medicines Agency Pre-authorisation Evaluation of Medicines for Human Use Withdrawal Assessment Report For Vorinostat MSD 100 mg hard capsules (Vorinostat) EMEA/H/C/947. London 23 October 2008 Doc Ref: EMEA/CHMP/559066/2008
- 128- Ayşe EKEN. Rat Kan ve Doku Örneklerinde Oksidatif Stres Parametreleri. *Journal of Clinical and Analytical Medicine*
- 129- Alfonso Pompella, Emilia Maellaro, Alessandro F. Casini, Marco Ferrali, Lucia Ciccoli, Mario Comporti. Measurement of Lipid Peroxidation In Vivo: A Comparison of Different Procedures. *LIPIDS*. Vol. 22, No. 3 (1987)
- 130- Erdiñç EREN, Alper ATA, Ali ARICAN. Kanser Tedavisinde Kullanılan İlaçlar Ve Nefrotoksisite. *DEÜ Tıp Fakültesi Dergisi* Cilt 26, Sayı 3, (Aralık) 2012, 229 – 235
- 131- Dong, G.; Luo, J.; Kumar, V.; Dong, Z. Inhibitors of histone deacetylases suppress cisplatin-induced p53 activation and apoptosis in renal tubular cells. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 2010, 298, F293–F300.
- 132- Hua Zhou, Yoshihide Fujigaki, Akihiko Kato, Takehiko Miyaji, Hideo Yasuda, Takayuki Tsuji, Tatsuo Yamamoto, Katsuhiko Yonemura and Akira Hishida. Inhibition of p21 modifies the response of cortical proximal tubules to cisplatin in rats. *AJP Renal Physiol* .Vol 291. July 2006.
- 133- Guie Dong, Jia Luo, Vijay Kumar, and Zheng Dong. Inhibitors of histone deacetylases suppress cisplatin-induced p53 activation and apoptosis in renal tubular cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 298: F293–F300, 2010.
- 134- Omnyah M.O. Bashraf, Ahmed S. Ali, Hala S.A. Eweis, Soad S Ali. Protective Effects of Low Dose Vorinostat on Cisplatin-induced Nephrotoxicity in Rats. *Curr Mol Pharmacol*. 2020 Dec 8. doi: 10.2174/1874467213666201209104335.
- 135- Hala Salah Abdel Kawy Eweis, Omnyah Mohammad Omar Bashraf, Ahmed Shaker Ali, Soad Shaker Ali. Antioxidant Traits and Protective Impact of Vorinostat against Cisplatin Induced Hepatotoxicity in Rats. *Journal of Pharmaceutical Research International*, Page 58-73 DOI: 10.9734/jpri/2020/v32i2830872
- 136- Li wang, Wei chen, Zhongjiang peng, Changcheng LIU, Caihong zhang, Zhiyong guo. Vorinostat protects against calcium oxalate-induced kidney injury in mice. *Mol Med Rep*. 2015 Sep; 12(3): 4291–4297

137- Mehdi Nematbakhsh, Farzaneh Ashrafi, Hamid Nasri, Ardeshir Talebi, Zahra Pezeshki, Fatemeh Eshraghi and Maryam Haghighi. A model for prediction of cisplatin induced nephrotoxicity by kidney weight in experimental rats. J Res Med Sci. 2013 May; 18(5): 370–373)

138- Villalta M, Sampaio TL, de Menezes RRPPB, Lima DB, Jorge ARC, Alves RS, Monteiro HSA, Gawarammana I, Maduwage K, Malleappah R, León G, Martins AMC, Gutiérrez JM: Nephrotoxicity induced by the venom of *Hypnale hypnale* from Sri Lanka: Studies on isolated perfused rat kidney and renal tubular cell lines. Toxicon. 2019 Jul;165:40-46.
doi: 10.1016/j.toxicon.2019.04.014.

139- de Moraes IC, Torres AF, Pereira GJ, Pereira TP, Pessoa Bezerra de Menezes RR, Mello CP, Coelho Jorge AR, Bindá AH, Toyama MH, Monteiro HS, Smaili SS, Martins AM.: *Bothrops leucurus* venom induces nephrotoxicity in the isolated perfused kidney and cultured renal tubular epithelia. Toxicon. 2013 Jan;61:38-46. doi: 10.1016/j.toxicon.2012.10.005. Epub 2012 Nov 2

9.ÖZGEÇMİŞ

Adı	YAŞAR	Soyadı	YILDIRIM
Doğum Yeri	DİYARBAKIR	Doğum Tarihi	24.08.1983
Uyruğu	TÜRKİYE CUMHURİYETİ	Tel	0(532)1773983
E-posta	yasaryildirim2000@yahoo.com		

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Doktora/Uzmanlık		
Tezli Yüksek Lisans		
Tezsiz Yüksek Lisans		
Lisans	İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi	2008
Lise		

İş Deneyimi

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1	Pratisyen Doktor	Diyarbakır İl Sağlık Müdürlüğü	2008-halen
2			
3			

Yabancı Dil Sınav Notu								
KPDS/ÜDS/YDS	YÖKDİL	IELTS	TOEFL IBT	TOEFL PBT	TOEFL CBT	FCE	CAE	CPE
	90							

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
ALES Puanı	85.321	82.629	79.317
(Diğer) Puanı			

10. EKLER

10.1. Etik Kurul Kararı

T.C.DİCLE ÜNİVERSİTESİ
PROF. DR. SABAHATTİN PAYZIN SAĞLIK BİLİMLERİ
ARAŞTIRMA VE UYGULAMA MERKEZİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU
(DÜHADEK)

ETİK KURUL KARARI

TOPLANTI TARİHİ	KARAR NO	TOPLANTI SAYISI
20.10.2017	4	7

KARAR

Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Meral ERDİNÇ'in yürütücüsü olduğu Araştırmacı Yaşar YILDIRIM, Doç. Dr. İlker Kelle, Doç. Dr. Hasan Akkoç, Arş.Gör.Meryem Şeyda KAYA, Uzm. Ecz. Zeynep Erdoğan, Arş. Gör. Emre Uyar, Prof.Dr.Levent ERDİNÇ'in yardımcı araştırmacı olarak yer aldığı, "**histon deasetilaz inhibitörü vorinostatın ratlarda oluşturulan sispaltin nefrotoksitesi üzerine koruyucu etkileri**" başlıklı ve 2017/16 protokol numaralı çalışma;

Deney Hayvanının	Türü	Cinsiyeti	Sayısı	Yaşı
	Sıçan (Sprague-Dawley)	Erkek	32	200-300 gr

Etik Kurulumuzca görüşülmüş olup araştırmanın oy çokluğu ile etik kurallara uygun olduğuna karar verilmiştir.

Prof. Dr. Beran YOKLUŞ
(BAŞKAN)

Yrd. Doç. Dr. Ulaş ALABALIK
(RAPORTÖR)

Prof. Dr. Ebru İNCE BOSTANCI
(ÜYE)

Doç. Dr. Hasan AKKOÇ
(ÜYE)

Yrd. Doç. Dr. Akın KOÇHAN
(ÜYE)

Öğr. Mehmet Yavuz KAHRAMAN
(ÜYE)

Prof. Dr. Filiz ACUN KAYA
(ÜYE)

Doç. Dr. Ayşe MESE
(ÜYE)

Yrd. Doç. Dr. Feray ALTAN
(ÜYE)

Yrd. Doç. Dr. Mehmet Huseyin ALKAN
(ÜYE)

Av. Abdullah YAVUZ
(ÜYE)

İletişim: DÜBTAM binası, Zemin Kat, DÜSAM laboratuvarları (İlahiyat Fak. Karşısı) 21280 Sur /DİYARBAKIR
E-posta: dusam@dicle.edu.tr Sekreteryası: 0 412 248 8431 (3956) Vet.Hekim: 0 412 2488001-16 hat (4423)

10.2. Orijinallik Raporu

	DİCLE ÜNİVERSİTESİ SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ TEZ İNTİHAL FORMU
ÖĞRENCİ BİLGİLERİ	
ADI VE SOYADI	Yaşar YILDIRIM
ÖĞRENCİ NO	10856001
EĞİTİM – ÖĞRETİM YILI	2020 - 2021
YARIYIL	☐ Güz ☒ Bahar
ANABİLİM DALI	Tıbbi Farmakoloji AD
PROGRAM	☐ Yüksek Lisans ☒ Doktora
TEZ KONUSU	Histon Deasetilaz İnhibitörü Vorinostatın Ratlarda Oluşturulan Sisplatin Nefrotoksitesisi Üzerine Koruyucu Etkileri.
İNTİHAL RAPORU BİLGİLERİ	
RAPOR TÜRÜ	Tez Savunma Sınavı Sonrası
SAYFA SAYISI	80
BENZERLİK ORANI	% 12
RAPORLAMA TARİHİ	10.06.2021
Yukarıda başlığı/konusu gösterilen tez çalışmamın kapak sayfası, giriş, ana bölümler, sonuç ve tartışma kısımlarından oluşan toplam 80 sayfalık kısmına ilişkin, 10/06/2021 tarihinde şahsım/tez danışmanım tarafından Turnitin adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan intihal raporuna göre, tezimin benzerlik oranı %12'tir. Uygulanan filtrelemeler: ☒ Kabul/Onay sayfaları hariç, ☒ Kaynakça hariç ☒ Alıntılar hariç/dâhil ☐ Diğer Dicle Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü Programlarda Tez Çalışması İntihal Raporu Uygulama Esasları'nı inceledim ve bu Uygulama Esasları'nda belirtilen azami benzerlik oranlarına göre tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edilmesi durumunda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim. Gereğini saygılarımla arz ederim.	
Prof. Dr. Meral ERDİNC Tez Danışmanı (İMZA/TARİH) 25.06.2021	Öğrencinin Adı Soyadı Yaşar YILDIRIM (İMZA/TARİH) 25.06.2021
Prof. Dr. Meral ERDİNC Anabilim Dalı Başkanı (İMZA/TARİH) 25.06.2021	

Formdaki bilgiler bilgisayar ortamında doldurulmalıdır. El yazısı ile doldurulan formlar geçersiz sayılmaktadır.

KGK-FRM-340/00

10.3. Tez İntihal Raporu

TEZ-HİSTON DEASETİLAZ İNHİBİTÖRÜ VORİNOSTATİN RATLARDA OLUŞTURULAN SİSPLATİN NEFROTOKSİSİTESİ ÜZERİNE KORUYUCU ETKİLERİ

ORJİNALLİK RAPORU

% 12	% 12	% 4	% 2
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	docplayer.biz.tr İnternet Kaynağı	% 4
2	acikerisim.dicle.edu.tr İnternet Kaynağı	% 2
3	acikerisim.dicle.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	% 2
4	kutup.dicle.edu.tr İnternet Kaynağı	% 1
5	jbiomedsci.biomedcentral.com İnternet Kaynağı	<% 1
6	cms.galenos.com.tr İnternet Kaynağı	<% 1
7	nek.istanbul.edu.tr:4444 İnternet Kaynağı	<% 1
8	Luyu Qi, Qun Luo, Yanyan Zhang, Feifei Jia, Yao Zhao, Fuyi Wang. "Advances in Toxicological Research of the Anticancer Drug	<% 1